

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Candidats dans la biogenèse mitochondriale au cours de la différenciation hépatogénique

Poncin, Pierre

*Award date:*  
2015

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**UNIVERSITE DE NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Candidats dans la biogenèse mitochondriale au cours de la  
différenciation hépatogénique**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Pierre PONCIN

Janvier 2015



**Université de Namur**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

## **Candidats dans la biogenèse mitochondriale au cours de la différenciation hépatogénique**

PONCIN Pierre

### Résumé

Les mitochondries sont des organites essentiels des cellules eucaryotes, elles jouent un rôle essentiel dans de nombreuses voies métaboliques comme la phosphorylation oxydative, le cycle de l'urée, l'oxydation des acides gras, ...

Il a récemment été montré que le métabolisme et la biogenèse mitochondriale interagissent avec la différenciation des cellules souches. En effet, la différenciation de cellules souches ES, iPS, mais aussi somatiques s'accompagne d'un switch d'un métabolisme glycolitique vers un métabolisme oxydatif et d'une biogenèse mitochondriale.

Au laboratoire, une récente caractérisation des mitochondries au cours de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse (BM-MSC) a permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de copies d'ADN mitochondrial (ADNmt), et de la respiration cellulaire, entre autres. Dans le but d'élucider les mécanismes moléculaires qui coordonnent la biogenèse mitochondriale et la différenciation hépatogénique, une analyse transcriptomique à haut débit a été réalisée. Parmi les candidats induits par le processus de différenciation, une protéine de la membrane interne de la mitochondrie, MPV17, a été sélectionnée. Encore très peu étudiée, celle-ci semble jouer un rôle dans le maintien et le nombre de copies d'ADNmt.

Dans ce mémoire nous avons confirmé l'induction de MPV17 au cours de la différenciation hépatogénique de BM-MSC humaines, et nous avons investigué le rôle potentiel de MPV17 dans l'augmentation de l'ADNmt observée au cours de la différenciation hépatogénique de BM-MSC. Pour ce faire MPV17 a été soit invalidé, soit surexprimé par le biais d'une stratégie de transduction lentivirale. Les principaux résultats suggèrent que l'invalidation de MPV17 n'affecte pas la différenciation hépatogénique, ni l'abondance et l'expression de l'ADN mitochondrial dans les cellules différenciées. Par contre, l'invalidation de cette protéine entraîne une augmentation de l'abondance de l'ADN mitochondrial lorsque les cellules sont en expansion, ainsi qu'une diminution de leur prolifération. Bien que contraires à l'hypothèse de départ, ces résultats originaux suggèrent que MPV17 pourrait exercer un rôle différentiel en fonction de l'état prolifératif cellulaire.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

**Promoteur:** P. Renard

## Remerciements

Et bien me voilà arrivé au bout, mémoire rendu aboutissement de 5 ans d'études, et de 10 mois de laboratoire où j'ai pu apprendre les premières ficelles de mon futur métier : biologiste.

Si je suis là aujourd'hui c'est grâce à de nombreuses personnes que je voudrais remercier.

Tout d'abord je tiens à remercier Anaïs Wanet. Je la remercie pour sa gentillesse et sa grande patience, moi qui n'étais jamais sur une gaffe, même après 2 mois de boulot. Merci de m'avoir souvent aidé quand j'étais noyé sous les manips et les cours. Je la remercie également pour m'avoir appris à être précis, minutieux et organisé, ce que j'étais loin d'être en commençant ce mémoire. Bref, merci pour tout, le biologiste que je serai en finissant mes études, c'est en grande partie à toi que je le devrai.

Je tiens également à remercier ma promotrice Patsy Renard, une encadrante toujours à l'écoute, je la remercie de m'avoir aidé à apprendre à communiquer un résultat scientifique, et également à écrire de manière scientifique. Merci d'avoir été présente surtout ces dernières semaines, et disponible pour les corrections de toute dernière minute.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe DYSO, pour leurs nombreux conseils lors des réunions hebdomadaires.

Je remercie également Lionel Schille et Xavier de Bolle pour leurs conseils concernant la construction plasmidique qui ne voulait jamais fonctionner, on a fini par y arriver et c'est grâce à vos nombreux conseils.

Une personne m'ayant également beaucoup aidé durant les dernières semaines de mon mémoire est Maude, je la remercie pour toutes les heures qu'elle a consacré à compter les cellules au BD pathway, et encore désolé pour toutes les migraines que ça t'a donné... ;-).

Bien d'autres personnes sont à remercier dans ce mémoire, premièrement mes collègues mémorants DYSO, Pierre (la tortue ninja) et Claire avec qui on aura passé une année vraiment géniale, avec des hauts, des bas et toujours là pour s'encourager quand un d'entre nous baissait les bras. Merci pour tout ça, pour les délires, les chansons, les matchs de la coupe du monde, les soirées/nuits et weekend au labo toujours à se serrer les coudes.

Je remercie également mes collègues mémorants Céline, Aurélie et Dimitri, pour leur soutien et d'avoir proposé leur aide en ce rush de fin de mémoire.

Une amie que je voudrais également remercier c'est Marjolaine, avec qui, comme d'habitude, fous rires et délires étaient au rendez-vous, courage dans ton nouveau boulot. Je remercie également Guy pour son amitié, toujours là pour redonner le moral quand ça ne va pas, toujours « la banane » et toujours le mot pour rire et toujours faire son possible pour qu'on ne manque de rien au labo, ne change pas Guy joyeux luron de l'URBC :-)

Je tiens également à remercier Bush, avec qui on a bavardé des heures de tout et de rien et qui était toujours prêt à abandonner sa manip en cours pour venir en aide à un mémorant en galère, je te souhaite beaucoup de chance pour la suite, good luck my friend !



Martine est également une personne que je voudrais remercier, pour nous avoir donné d'énormes coups de main surtout quand on devait coater 40 boîtes T75 au collagène, toujours là pour rendre service, un grand merci. Merci aussi à Antoine qui est également toujours prêt à rendre service.

Et je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont encouragé quand on se croisait les week-ends : Edith, Emilie, Mélanie, Morgane, ... et j'en passe sûrement merci à toutes.

Je tiens à te remercier toi Sandrine pour ta patience, toi qui finissais par devenir jalouse de ces cellules souches avec qui je passais plus de temps qu'avec toi ces dernières semaines. Merci de m'avoir soutenu, et cru en moi. Et merci à ta famille, qui a toujours été là pour m'encourager.

Et enfin, je remercie mes parents sans qui je n'aurais jamais pu faire ces études et arriver là où j'en suis. Merci d'avoir cru en moi, et merci de m'avoir encouragé malgré les échecs, les hauts, les bas... J'y serai quand même arrivé, et c'est grâce à vous. Merci à vous et mes frères et sœurs, qui m'ont soutenu jusqu'au bout.

# Table des abréviations



## Table des abréviations

AAV	Adeno-associated virus
ADH-LSC	Adult Derived Human Liver Stem Cells
ADNmt	ADN mitochondrial
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AMPK	AMP-Activated protein Kinase
BM-MSC	Bone-marrow mesenchymal stem cells
CaMKIV	(Protéine kinase 4 Ca <sup>2+</sup> /calmoduline dépendante)
CCCP	(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CEBP $\beta$	(CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), $\beta$ )
cGMP :	Cycle Guanosine monophosphate
COX	cytochrome c oxydase
CREB	cAMP response element binding protein
D-loop	(displacement loop),
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
ERK2	Extracellular signal-regulated kinases
ERR :	Estrogen-related Receptor
ESC	Embryonic stem cells
Exp	cellules en expansion
(FBS)	sérum foetal bovin
FoxO1	Forkhead box class-O
GCN5	general control of aminoacid synthesis
GFP	Green fluorescent protein
GUOK	déoxyguanosine kinase
HA	Hémaglutinine
HES1	hes family bHLH transcription factor 1
HIF-1 $\alpha$	hypoxia inducible factor
HSP	High strand promoter
IDCR	Ionic Detergent Compatibility Reagent
IMDM	Iscove's Modified Dubelcco's Medium
iPSCs	induced pluripotent stem cells
KLF2	Kruppel-like factor 2
KLF4	Kruppel-like factor 4
LRP130	Leucine-rich PPR
LSP	Light strand promoter
MDDS :	mitochondrial deletion disease
MEF	Myocyte enhancer factor
MEK,	mitogen-activated protein kinase kinase 2
mtCO1	gène mitochondrial codans pour la sous unité 1 de la cytochrome c oxydase
mtCO2	gène mitochondrial codans pour la sous unité 2 de la cytochrome c oxydase
mTERF	facteur de terminaison de la transcription mitochondrial
mtSSB	protéines liant l'ADNmt simple brin

ND2	NADH dehydrogenase subunit 2
ND5	NADH dehydrogenase subunit 5
ND6	NADH dehydrogenase subunit 6
NRF	nuclear respiratory factor
NRF1	Nuclear respiratory factor 1
OCT4	octamer-binding transcription factor 4
PDK	Pyruvate déshydrogénase kinase
PGC-1 $\alpha$	PPAR $\gamma$ coactivator-1
PKA	protein kinase A
POLG1	sous unité de l'ADN polymérase $\gamma$
POLG2	sous unité de l'ADN polymérase $\gamma$
PolRMT	ARN polymérase mitochondriale
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPIE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase E
PRC	PGC-1-related coactivator
PTPMT1	protein tyrosine phosphatase mitochondrial 1
RITOLS	RNA Fragments Incorporated ThroughOut the Lagging Strand
shMPV17	shRNA ciblant l'ARNm de MPV17
shNT	shRNA sans cibles
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-prenicillamine
SOX2	sex determining region Y-box 2
SYM1	
TCF7L2	transcription factor 7-like 2
TFAM	Facteur de transcription mitochondrial A
TFB1M	Facteur de transcription mitochondrial B1
TFB2M	Facteur de transcription mitochondrial B2
TOM20	Transporter of the outer membrane 20 kDa
UCP2	protéine découplante mitochondriale 2
UC-MSC	Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells



# Table des matières

I : Introduction .....	1
1. Caractéristiques des cellules souches .....	1
2. Changements métaboliques des cellules souches au cours de la différenciation .....	2
3. La biogenèse mitochondriale .....	4
3.1 : Organisation de l'ADN mitochondrial .....	4
3.2 : Réplication de l'ADN mitochondrial .....	7
3.3 : Transcription de l'ADN mitochondrial .....	8
3.4 : Régulation de la biogenèse mitochondriale .....	8
4 : Caractérisation de la biogenèse mitochondriale lors de la différenciation hépatogénique .....	12
4.1 : Résultats précédant : .....	12
4.2 : MPV17 : une protéine impliquée dans la maintenance de l'ADNmt .....	14
Objectifs du mémoire .....	18
II: Matériel et méthodes .....	19
Cultures cellulaires .....	19
Différenciation hépatogénique des BM-MSC .....	19
Quantification de l'abondance relative d'ARNm par qRT-PCR .....	20
Quantification par q-PCR de l'ADN mitochondrial (ADNmt) .....	21
Extraction protéique .....	21
Western blot .....	21
Immunofluorescence .....	21
Construction d'un plasmide lentiviral de surexpression de MPV17 .....	22
Vecteurs lentiviraux de répression de MPV17 .....	22
Transformation d'E.Coli compétentes et PCR sur colonies .....	22
Transfection de cellules HEK-293T avec le vecteur de répression/surexpression de MPV17 .....	23
Transduction de BM-MSC avec des lentivirus .....	23
Test de prolifération .....	24
III : Résultats et discussion .....	25
1 : Validation de l'induction de MPV17 lors de la différenciation hépatogénique .....	25
1.1 : Abondance relative de transcrit MPV17 au cours de la différenciation hépatogénique .....	25
1.2 : Abondance protéique de MPV17 au cours de la différenciation hépatogénique .....	25
2 : Localisation sub-cellulaire de MPV17 .....	25
3. Effets de la modulation de l'expression de MPV17 sur le phénotype mitochondrial au cours de la différenciation hépatogénique .....	26
3.1 : Efficacité de l'inactivation de MPV17 .....	26
3.2 : Efficacité de la surexpression de MPV17 .....	27
4. Impact de la modulation de MPV17 sur l'abondance d'ADNmt au cours de la différenciation hépatogénique .....	28
4.1 : Impact de l'inactivation de MPV17 sur l'abondance de l'ADNmt durant la différenciation hépatogénique .....	28
4.2 : Impact de la surexpression de MPV17 sur l'abondance d'ADNmt durant la différenciation hépatogénique .....	29
4.3. Visualisation par immuno-fluorescence de l'impact de l'inactivation de MPV17 sur l'ADNmt .....	29
5. Mesure de l'abondance relative de transcrits d'acteurs de la réplication de l'ADNmt .....	30
6. Effet de l'inactivation de MPV17 sur la transcription de l'ADNmt .....	31
7. Effet de l'inactivation de MPV17 sur les marqueurs de différenciation hépatogénique .....	32
8. Impact de la modulation de MPV17 sur la prolifération cellulaire des BM-MSC .....	35
8.1 : Impact de l'inactivation de MPV17 sur la prolifération .....	35
8.2 : Impact de la surexpression de MPV17 sur la prolifération .....	35
9. Etude de l'impact de l'inactivation de MPV17 dans d'autres types cellulaires en prolifération .....	36
9.1 : Impact de l'inactivation de MPV17 sur l'abondance de l'ADNmt de trois types cellulaires en prolifération .....	36
9.2 : Impact de l'inactivation de MPV17 sur la prolifération de trois types cellulaires différents .....	37
IV. Conclusion .....	38



# **I : Introduction**

## **1. Caractéristiques des cellules souches**

Les cellules souches sont des cellules caractérisées par deux propriétés principales : l'auto-renouvellement, c'est-à-dire la capacité de se renouveler afin de maintenir le pool de cellules souches, et la pluripotence qui se définit par la capacité de se différencier en une ou plusieurs lignées cellulaires (pour une revue voir (Rehman, 2010)).

Plusieurs types de cellules souches peuvent être distingués. Premièrement les cellules souches embryonnaires (ES) : jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour après fécondation chez l'Homme, les cellules souches de l'œuf sont totipotentes, (c'est à dire qu'elles peuvent donner un organisme entier). Au stade blastocyste (5-8<sup>e</sup> jour) les cellules de la masse cellulaire interne sont pluripotentes, elles sont à l'origine des 220 types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires : endoderme, mésoderme, ectoderme (Martin, 1981, Thomson et al., 1998).

Deuxièmement, les cellules souches somatiques (SSC) telles que les cellules souches mésenchymateuses ou les cellules hématopoïétiques impliquées dans le remplacement continu des cellules sanguines. Ces cellules souches somatiques sont présentes chez les organismes adultes et ont pour rôle le maintien et la régénération tissulaire. Troisièmement, il y a les cellules germinales, à l'origine de la formation des gamètes.

A côté de ces classes de cellules souches naturelles, il existe également des cellules pluripotentes induites (iPSCs). En effet, des fibroblastes ont été reprogrammés en iPSCs via la surexpression de régulateurs de pluripotence : OCT4, SOX2, c-MYC et KLF4 (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Tous ces types de cellules souches constituent un espoir dans le domaine de la thérapie cellulaire, par exemple pour la reconstruction osseuse, la régénération de la rétine, du foie... Les cellules embryonnaires soulevant des questions éthiques, et les cellules iPSCs n'étant pas encore totalement sûres pour être utilisées au niveau de la thérapie cellulaire, les cellules souches mésenchymateuses semblent être les meilleures candidates.

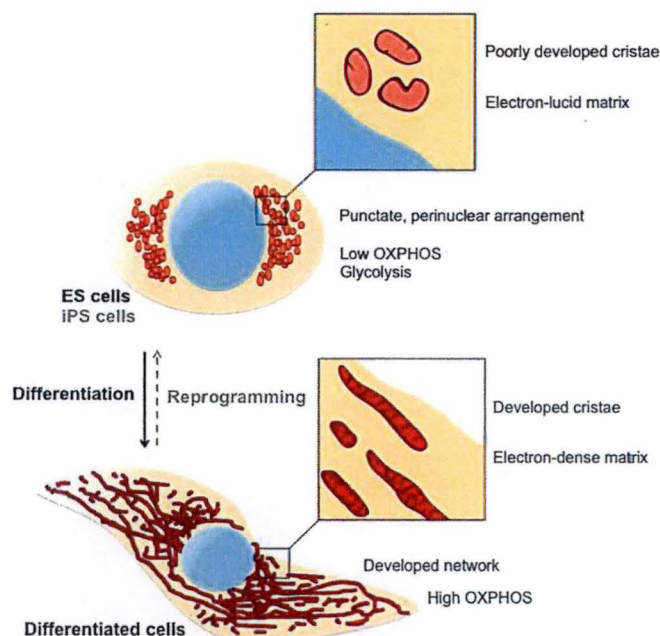
Les cellules souches mésenchymateuses (MSC), identifiées par Friedenstein en 1968 (Friedenstein et al., 1968) sont des cellules pluripotentes capables de se différencier en plusieurs lignées cellulaires telles que les ostéocytes, chondrocytes, adipocytes, ... Ces cellules sont présentes en minorité dans la moëlle osseuse on peut estimer leur occurrence à plus ou moins 1 cellule sur 10000. Le principal avantage des cellules souches mésenchymateuses est leur capacité immuno-évasive. En effet, les cellules souches mésenchymateuses peuvent avoir un effet régulateur sur le système immunitaire adaptatif et inné. Cette propriété a par exemple été mise en évidence dans le traitement de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte, où les CSM ont montré un effet immuno-modulateur dans le cadre d'une greffe de moëlle (Le Blanc et al, 2004).

De manière intéressante, la différenciation de ces différents types de cellules souches s'accompagne non seulement de l'acquisition de caractères spécifiques au type cellulaire généré, mais également de changement métaboliques. Abordons maintenant ces changements.



## 2. Changements métaboliques des cellules souches au cours de la différenciation

Au cours de la différenciation de cellules souches, certaines modifications ont été mises en évidence. En effet, les cellules souches ont pour source d'ATP un métabolisme préférentiellement glycolytique et leur différenciation est accompagnée d'un « switch » métabolique vers un métabolisme oxydatif (Zhang et al., 2011, Chung et al., 2010, Lonergan et al., 2007). Ce switch métabolique peut être interprété de différentes manières : le besoin d'ATP lors de la différenciation, la protection du génome contre les ROS, et le fait que les cellules souches sont souvent situées dans une niche anaérobie (Spencer et al., 2014, Cipolleschi et al., 1993). Ces variations métaboliques ont surtout été documentées dans les cellules ES où il a été montré qu'un changement de morphologie des mitochondries et une induction de la biogenèse mitochondriale accompagnent ces changements métaboliques. Les mitochondries des cellules ES ont une localisation périnucléaire, ont des crêtes peu développées, alors que les mitochondries des cellules différenciées ont des crêtes plus développées, une localisation périphérique et une abondance plus importante. (Sathananthan et al., 2002, Chung et al., 2010, St John et al., 2005). L'augmentation de l'abondance des mitochondries au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires s'accompagne d'une augmentation du nombre de copies d'ADN mitochondrial (ADNmt) (Facucho-Oliveira et al., 2007). L'inverse de ces modifications est observé lors d'une reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS (Prigione et al., 2010, Folmes et al., 2011), et au moins en partie lors de la dédifférenciation spontanée d'hépatocytes primaires (Wanet et al., 2014), un phénomène appelé le rajeunissement mitochondrial (Figure I.1).



**Figure I.1: Changements métaboliques et morphologiques des cellules souches et cellules différenciées.**

Les mitochondries des cellules souches embryonnaires présentent une localisation périnucléaire, des crêtes peu développées et un réseau mitochondrial peu développé comparé à celui des cellules différenciées. La différenciation est accompagnée d'un switch d'un métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif. Le phénomène inverse est observé lors de la reprogrammation en cellules iPS : c'est le rajeunissement mitochondrial. (A.Wanet et al ; 2012).



Plusieurs équipes ont démontré que les changements morphologiques et fonctionnels des mitochondries n'étaient pas simplement corrélés avec la différenciation, mais semblaient y participer. Interférer par exemple avec la glycolyse ou la chaîne de transport d'électrons semble avoir un impact sur la différenciation. En effet, en inhibant le complexe III de la chaîne de transport d'électrons à l'aide d'antimycine A, la différenciation en cardiomyocytes est réduite (Spitkovsky et al., 2004). L'équipe de Mandal a montré qu'en inhibant la chaîne respiratoire grâce à un agent découplant, le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone), la différenciation de cellules souches embryonnaires est inhibée et que l'expression de différents gènes caractéristiques de la pluripotence était augmentée, tandis que les gènes caractéristiques de la différenciation sont réprimés (Mandal et al., 2011). Prowse et ses collègues ont par ailleurs montré qu'en renforçant la phosphorylation oxydative grâce à différents agents chimiques tels que l'AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, un activateur de l'AMPK) et le SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-prenicillamine, un donneur de NO), la différenciation de cellules souches embryonnaires est accrue (Prowse et al., 2012).

Bien que la relation entre le switch métabolique et la différenciation soit encore peu comprise au niveau moléculaire, Zhang et son équipe suggèrent, dans la différenciation cardiomyocytaire, que la protéine découplante mitochondriale 2 (UCP2) réduirait le passage du pyruvate à l'intérieur de la mitochondrie dans les cellules souches. Le pyruvate entrerait donc peu dans le cycle de Krebs sous forme d'acétyl-coA, et l'activité de la chaîne de transport d'électrons serait donc minimale (Zhang et al., 2011). De plus, il a récemment été montré qu'en inhibant PTPMT1 (protein tyrosine phosphatase mitochondrial 1, localisée dans la membrane mitochondriale interne), les cellules souches hématopoïétiques étaient incapables de se différencier. Or le substrat de cette phosphatase : le phosphatidylinositol phosphate, augmente l'activité d'UCP2 (Yu et al., 2013).

Le métabolisme préférentiellement glycolytique des cellules souches peut avoir pour origine leur niche anaérobie. En effet, le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor) semble avoir une activité importante dans les cellules souches. En 2013, Tabuko et ses collaborateurs ont montré que dans les cellules souches hémapoïétiques, l'expression d'HIF-1 $\alpha$  est essentielle au maintien du caractère souche. HIF1 $\alpha$  active l'expression des transporteurs de glucose (pour en augmenter son absorption) ainsi que celle des pyruvate déshydrogénase kinases (PDK) qui inhibent l'action de la pyruvate déshydrogénase (dont le rôle est de convertir le pyruvate en acétyl-coA), inhibant la respiration. Quand la tension en O<sub>2</sub> augmente, HIF1 $\alpha$  est hydroxylé par trois prolyl-hydroxylases activées par l'oxygène. Une fois hydroxylé, HIF1 $\alpha$  est ubiquitinylé et dégradé. Il a récemment été démontré que lors de la reprogrammation de fibroblastes en cellules iPS, HIF1 $\alpha$  active l'expression de PDK1, PDK3 et l'isoforme M2 de la pyruvate kinase, avec comme effet un switch métabolique en faveur de la glycolyse (Prigione et al., 2014).

Les cellules souches montrent en effet une sur-expression de gènes codant pour les transporteurs de glucose, et les enzymes impliquées dans les premières étapes de la glycolyse, ainsi qu'un niveau de glucose-6-phosphate plus élevé (Prigione et al., 2011). Ceci indique une voie des pentoses phosphates très active dans ces cellules, générant ainsi des précurseurs de nucléotides, mais aussi du NADPH, nécessaire aux défenses antioxydantes.



Ces changements métaboliques survenant au cours de la différenciation ont été largement documentés dans les cellules ES et les cellules iPS, mais peu dans les cellules souches somatiques. L'équipe de Chen a mis en évidence que la différenciation ostéogénique de cellules souches mésenchymateuses s'accompagne d'une biogenèse mitochondriale caractérisée par une augmentation de la masse mitochondriale, mais également du nombre de copies d'ADNmt, et une augmentation d'expression de PGC-1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$  coactivator-1). Une augmentation de la respiration cellulaire a également été observée. Une augmentation du niveau protéique de certaines sous-unités des complexes respiratoires a été observée, alors que dans un même temps, la concentration en lactate diminue, ce qui suggère un switch d'un métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif (Chen et al., 2008). L'équipe de Zhang a récemment mis en évidence les mêmes caractéristiques de biogenèse mitochondriale accompagnant la différenciation adipogénique de cellules souches mésenchymateuses (Zhang et al., 2013). Tormos et ses collègues ont par ailleurs mis en évidence l'implication du complexe III dans la différenciation adipogénique. En effet, en la transcription de PPAR $\gamma$  (un régulateur clé de la différenciation adipogénique) semble être directement corrélée au niveau de ROS généré par le complexe III. (Tormos et al., 2011)

Dans ce mémoire nous utilisons les cellules souches mésenchymateuses humaines, lesquelles sont différenciées en « hépatocytes-like » selon un protocole de différenciation *in vitro* (voir méthodes). Les aspects métaboliques de la différenciation hépatogénique ont été peu documentés jusqu'à présent (Wanet et al., 2014) contrairement à la différenciation adipogénique (Tormos et al., 2011, Zhang et al., 2013) et ostéogénique (Chen et al., 2008, Hsu et al., 2013). Or l'activité et l'abondance mitochondriale dans les hépatocytes sont très élevées. En effet, outre la production d'ATP, ces organites hébergent également des étapes du cycle de l'urée, propre à ce type cellulaire particulier, d'où l'intérêt d'étudier ce type de différenciation, et la biogenèse mitochondriale qui interagit avec elle.

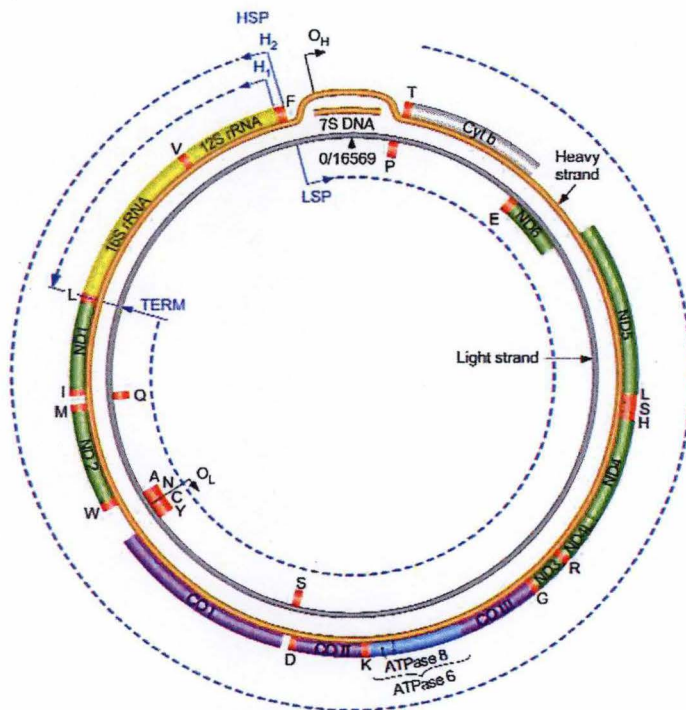
### 3. La biogenèse mitochondriale

Les mitochondries sont des organites essentiels des cellules eucaryotes. D'origine endosymbiotique, les mitochondries sont impliquées dans de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de l'urée, l'oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative, etc... Celle-ci consiste en une chaîne de transport d'électrons comprenant 4 complexes enzymatiques et la FoF1 ATP synthase générant une force protomotrice permettant ainsi de générer de l'ATP. Bien que la plupart des sous-unités constituant ces complexes protéiques soient encodées par le génome nucléaire, certaines sous-unités sont encodées par le génome mitochondrial, que nous décrivons ci-dessous.

#### 3.1 : Organisation de l'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est une molécule d'ADN bicaténaire et circulaire de 16.569 paires de bases chez l'Homme. Celui-ci contient des gènes (sans introns) codant pour 2 ARN ribosomiaux, 22 ARN de transferts, et 13 sous-unités impliquées dans la chaîne de transport d'électrons (7 sous-unités du complexe I, 1 sous unité du complexe III, 3 sous unités

du complexe IV et 2 sous-unités du complexe V). La majorité de ces gènes sont codés par le brin lourd (H = heavy strand) (Anderson et al., 1981, Andrews et al., 1999). Il existe aussi 1,1 kb de séquence non-codante, la D-loop (displacement loop), comportant les régions promotrices du brin lourd (HSP) et du brin léger (LSP) mais aussi l'origine de réplication du brin lourd (Figure I.2) Le HSP initie la transcription au niveau d'un site H<sub>2</sub> (permettant la transcription des ARNm, ARNt, ARNr) et un site H<sub>1</sub> (ne permettant que la transcription des ARNr).



**Figure I.2 : Organisation du génome mitochondrial humain (Renard et al., 2012)**

Le génome mitochondrial humain est une molécule d'ADN circulaire, composée d'un brin lourd (Heavy strand) et un brin léger (Light strand), il code pour 13 polypeptides impliqués dans la chaîne respiratoire, 2 ARN ribosomiaux (jaune) et 22 ARN de transferts (rouge). Le promoteur du brin léger (LSP) et du brin lourd (HSP) et l'origine de réplication du brin lourd (OH) se trouvent dans une séquence non-codante appelée la boucle D (D-loop).

Cet ADN mitochondrial est compacté en un complexe nucléoprotéique appelé le nucléoïde mitochondrial. Comme illustré dans la Table 1, de nombreuses protéines ont été identifiées comme faisant partie, ou étant associées au nucléoïde mitochondrial. Celles-ci ont été mises en évidence en utilisant diverses techniques biochimiques telle que la co-immunoprécipitation, le gel shift assay, l'immunofluorescence, ... La plupart de ces protéines associées à l'ADNmt sont impliquées 1) dans la réplication : TFAM, POLG1, POLG2, ... 2) dans la transcription : PolRMT, LRP130, TFB1M, TFB2M, ... 3) dans la traduction 4) dans la maintenance de l'ADNmt.



Protéine	Gène	Fonction
TFAM	TFAM	mtDNA packaging, Replication and Transcription
mtSSB	SSBP1	mtDNA single strand protection, control of 7s DNA synthesis
EFTu	TUFM	Translation elongation
DEAH box polypeptide 30-2	DHX30	Hélicase ARN
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	Hydroxyacyldéshydrogénase
mtRNA polymerase	POLRMT	Transcription de l'ADNmt
Serine hydroxymethyltransferase	SHMT2	Conversion de 5,10-CH <sub>2</sub> -THF + glycine en THF et sérine
LRP130 (Leucine-rich protein 130)	LRPPRC	Transcription de l'ADNmt
AAA-ATPase	ATAD3A	Maintenance de l'ADNmt
LRRC59	LRRC59	organisation de l'ADNmt, du nombre de copies et de sa ségrégation
Prohibitin 1	PHB1	Organisation et maintenance de l'ADNmt
Prohibitin 2	PHB2	
mtDNA polymerase g A	POLG	Réplication de l'ADNmt
mtDNA polymerase g B	POLG2	Réplication de l'ADNmt
ANT2	SLC25A5	Adénine nucléotide transférase
ANT3	SLC25A6	Adénine nucléotide transférase
Twinkle	PEO1	Hélicase mitochondriale
Trifunctional enzyme subunit beta	HADHB	Beta-oxydation des acides gras
HSP 70	HSPA1	Chaperonne
Lon protease	LONP1	Maintenance de l'ADNmt
SUV3-like helicase	SUPV3L1	Fait partie du dégradosome de l'ARN
TFB1M	TFB1M	Transcription de l'ADNmt
TFB2M	TFB2M	Transcription de l'ADNmt
Branched chain ketoacid dehydrogenase subunit E2	DBT	Dégradation d'acide aminé : isoleucine, leucine, valine
DNAJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial (TID1)	DNAJA3	Prolifération, transduction du signal apoptotique
PDIP38	PDIP38	
DNA topoisomerase 1, mitochondrial	TOP1MT	Réplication de l'ARN
Mterf	MTERF	Transcription de l'ARN
DEAD box 28	DDX28	Hélicase ARN
AFG3 ATPase family gene 3-like 2	AFG3L2	
MTERF domain containing 1	MTERFD1	
YME 1-like isoform 1	YME1L1	
ATPase family, AAA domain containing 3B	ATAD3B	Maintenance de l'ADNmt
C4orf14	NOA1	organisation de l'ADNmt, du nombre de copies et de sa ségrégation
B-actin	ACTB1	Organisation et structure de l'ADNmt
Pentatricopeptide repeat-containing protein 3	PTCD3	
Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial	ICT1	
CRIF1	GADD45GIP1	Regulation du cycle cellulaire
MTHSP75	HSPA9	Prolifération cellulaire, réponse au stress et maintenance de la mitochondrie
PDC-E2	DLAT	Conversion du pyruvate en acétyl-CoA
Myosin, heavy chain 9, non-muscle	MYH9	Organisation et maintenance structurale de l'ADNmt
Mitochondrial nucleoid factor 1 (M19)	MNF1	Corrélation entre M19 et l'abondance en ADNmt
mitochondrial ribosome recycling factor isoform 1	MRRF	Synthèse protéique mitochondriale
NIPSNAP	NIPSNAP1	
heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	HSPE1	Chaperonne
39S ribosomal proteins (~50 total)		
28S ribosomal proteins (~31 total)		

Tableau I.1 : Protéines associées aux nucléoides mitochondriaux humains.

(Adapté de : Renard et al, 2012 ; Hensen et al, 2014)



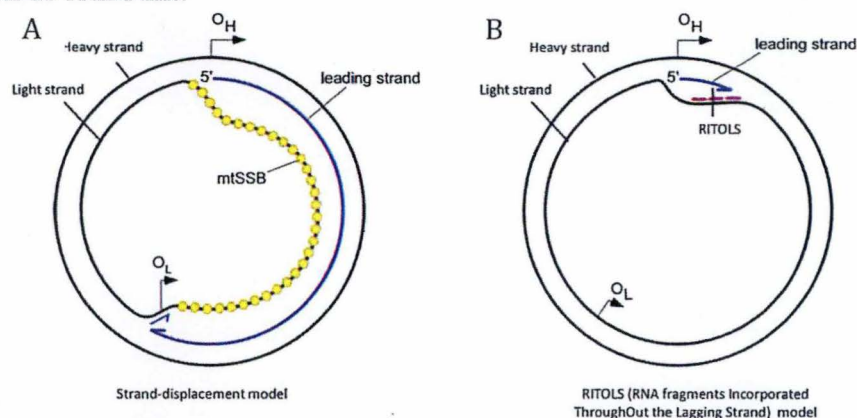
L'acteur principal du compactage, ou du moins le mieux caractérisé, est le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM). Ce dernier assure plusieurs fonctions : premièrement une fonction de compactage de l'ADN mitochondrial, et deuxièmement une implication dans sa réplication et sa transcription. Nous reviendrons à ce facteur de transcription plus loin.

### 3.2 : Réplication de l'ADN mitochondrial

Plusieurs modèles de réplication de l'ADN mitochondrial existent. Le premier modèle est le modèle de réplication asynchrone : une hélicase mitochondriale (Twinkle) sépare le brin lourd et le brin léger au niveau de la D-loop (Robberson et al., 1972). Pour commencer la réplication, une amorce d'ARN doit d'abord être transcrite par une ARN polymérase mitochondriale (PolRMT). Cet ARN est codé par une séquence appelée LSP (light strand promoter). Une fois l'amorce clivée et hybridée sur le brin lourd, l'ADN polymérase  $\gamma$  (encodée par POLG1 et POLG2) va commencer sa réplication. Au fur et à mesure que la réplication du brin lourd avance, le brin lourd parental est déplacé jusqu'aux 2/3 de la molécule d'ADN et protégé par des protéines liant l'ADNmt simple brin (mtSSB). mtSSB augmente également la processivité de Poly $\gamma$ , et l'activité de Twinkle. Aux 2/3 de la molécule d'ADNmt se situe l'origine de réplication du brin léger, et à partir de ce point, la réplication du brin léger commence dans le sens opposé (Figure I.3. A)

Le second modèle de réplication de l'ADNmt, aussi appelé le modèle RITOLS (RNA Fragments Incorporated ThroughOut the Lagging Strand), est plus semblable au modèle de réplication du génome nucléaire. En effet, ce modèle propose que la réplication du brin lourd est continue de 5' en 3', et la réplication du brin léger inclurait des fragments d'Okazaki d'environ 200 nucléotides (Figure I.3. B) (Holt et al., 2000).

TFAM est impliqué dans la réplication en initiant la transcription du primer d'ARN codé par le LSP (light strand promoter). Il est également impliqué dans la régulation de la transcription de l'ADNmt.



**Fig I.3: Modèles de réplication du génome mitochondrial humain (Renard et al., 2012)**

**(A) Le modèle de déplacement du brin :** le brin lourd est déplacé et répliqué jusqu'aux 2/3 de la molécule, où se situe l'origine de réplication du brin léger, l'ADN simple brin est protégé par des protéines mtSSB (mitochondrial single strand binding protein). Alors commence la réplication du brin léger dans le sens opposé.

**(B) Le modèle RITOLS (RNA Fragment Incorporated ThthroughOut Lagging Strand) :** Les deux brins sont synthétisés en même temps, le brin léger étant répliqué grâce à des fragments d'Okazaki (+/- 200nt) appelés RITOLS.

### *3.3 : Transcription de l'ADN mitochondrial*

La transcription de l'ADN mitochondrial est régulée par TFAM, TFB1M et TFB2M (Mitochondrial Transcription Factor B1 et B2), et le facteur de terminaison mTERF (Gleyzer et al., 2005). Le facteur de transcription TFAM a une grande affinité pour l'ADN, et ce indépendamment de la séquence. Il semblerait toutefois que son affinité soit plus grande au niveau de la D-Loop. La structure cristallographique de TFAM révèle sa capacité à courber l'ADN de 180°. Certains auteurs estimant qu'une molécule TFAM serait située tous les 30-40 paires de bases, TFAM pourrait à lui seul être à l'origine du compactage de l'ADNmt (Ngo et al., 2011).

TFAM forme une structure en U au niveau de la D-loop, ce qui permettrait d'initier la transcription, grâce à TFB1M et TFB2M tous deux capables de former des hétérodimères avec POLRMT (RNA polymérase mitochondriale) (Falkenberg et al., 2002). Bien que TFB1M soit impliqué dans la transcription de l'ADNmt, il semblerait que son activité principale soit une activité diméthyltransférase. En effet, TFB1M diméthyle deux adénines de l'ARNribosomal 12S, ce qui contribuerait à la formation de la petite sous-unité du ribosome mitochondrial (Metodiev et al., 2009).

### *3.4 : Régulation de la biogenèse mitochondriale*

#### *3.4.1 : Rôle des différents acteurs*

La biogenèse mitochondriale comprend plusieurs aspects : la réplication de l'ADNmt comme expliqué précédemment, l'aspect lipidique afin de garantir un pool suffisant pour les membranes, et l'aspect protéique qui va être détaillé ici.

Bien que le protéome mitochondrial se compose de plus ou moins 1500 protéines différentes, seules 13 d'entre elles sont encodées par le génome mitochondrial, et ce sont toutes des sous-unités de complexes de la chaîne respiratoire (Fisher et al., 1987). Les autres protéines mitochondriales étant codées par le génome nucléaire, il est donc nécessaire d'avoir une coordination entre ces deux génomes.

La biogenèse mitochondriale est régulée par des facteurs de transcription et des co-activateurs (Figure I.4 ; Tableau I.1). La transcription des gènes nucléaires encodant des protéines mitochondriales est régulée par, premièrement NRF1 (Nuclear respiratory factor 1) qui contrôle l'expression des gènes impliqués dans la transcription de l'ADNmt (TFAM, TFB1M, TFB2M), ainsi que les gènes des OXPHOS. NRF2 régule également l'expression de

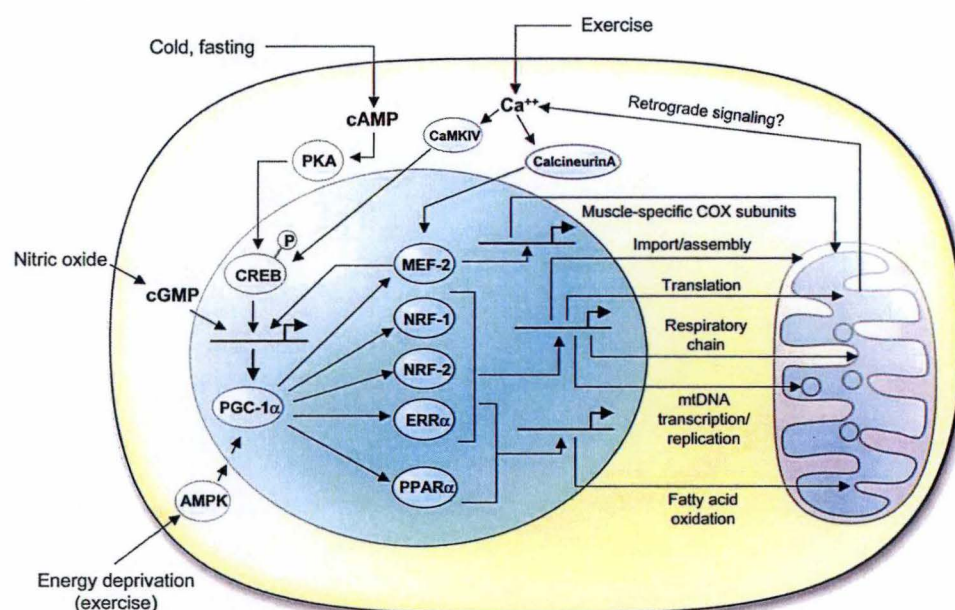


BOX 1. Main transcription factors involved in mitochondrial biogenesis

Transcription factor	Regulated genes	Refs.
NRF-1	Respiratory subunits Mitochondrial heme synthesis Mitochondrial importation system and assembly Mitochondrial translation (ribosomal proteins, tRNA synthetases) MtDNA replication, transcription and translation	Scarpulla (2008b)
NRF-2 TFAM ERR $\alpha$	Respiratory subunits, Tfam, TFB1M, TFB2M mtDNA Respiratory subunits, mitochondrial importation system, oxidative metabolism, mitochondrial dynamics-associated genes	Mootha et al. (2004), Schreiber et al. (2004)
PPAR $\alpha$ PPAR $\gamma$ Thyroid hormone CREB $\beta$ YY1 C-MYC $\beta$ MEF-2 $\beta$	Oxidative metabolism Uncoupling proteins Cytochrome c, PGC-1 $\alpha$ COX genes MtDNA polymerase, NRF-1 target genes, PGC-1 $\beta$ PGC-1 $\alpha$ , muscle-specific COX subunits	Vega et al. (2000) Puigserver et al. (1998) Weitzel and Alexander Iwen (2011) Franko et al. (2008), Vercauteren et al. (2006) Basu et al. (1997), Cunningham et al. (2007) Li et al. (2005), Morrish et al. (2003) Handschin et al. (2003), Ramachandran et al. (2008), Wan and Moreadith (1995)
SPI ATF2 $\beta$ NFAT $\beta$	Tfam, TFB1M, TFB2M, POL $\gamma$ 2, ANT2 PGC-1 $\alpha$ , UCPI PGC-1 $\alpha$	Evans and Scarpulla (1989), Li et al. (1996a,b) Cao et al. (2004) Olson and Williams (2000)

PGC-1 $\alpha$ , Peroxisome-proliferator activated receptor Gamma Co-activator-1 alpha; NRF1/2, nuclear respiratory factor 1/2; TFAM, mitochondrial transcription factor A; ERR $\alpha$ , estrogen-related receptor alpha; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; CREB, cAMP response-element binding protein; YY1, yin-yang1; MEF-2, myocyte enhancer factor-2; SPI, specificity protein 1; HNF4, hepatocyte nuclear factor 4; ATF2, activating transcription factor-2; FoxO1, forkhead box protein O1; NFAT, nuclear factor of activated T-cells; COX, cytochrome c oxidase; POL $\gamma$ , DNA polymerase gamma; ANT2, adenine nucleotide translocator.  
\*Regulate PGC-1 expression.

Tableau I.1 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale



**Figure I.4 : Régulation de la transcription des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales.** La famille de co-régulateurs PGC-1 (PGC-1 $\alpha$  ; PGC-1 $\beta$ , PRC) régule l'expression de certains gènes mitochondriaux en se liant à des facteurs de transcription. Ceux-ci sont impliqués dans la traduction mitochondriale, la chaîne respiratoire, la réplication et la transcription d'ADNmt ainsi que l'oxydation des acides gras. La transcription de PGC1- $\alpha$  peut elle-même être activée 1) par l'action de **CREB** (cAMP response element binding protein) qui est phosphorylé entre autres par la **CaMKIV** (Protéine kinase 4 Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dépendante) ou la **PKA** (protéine kinase A), 2) par **MEF2** (Myocyte enhancer factor) phosphorylé par la **Calcineurin A**. L'**AMPK** (AMP-Activated protein Kinase) phosphoryle PGC1- $\alpha$  (Scarpulla et al ; 2008).  
mtDNA (ADN mitochondrial) ; cAMP : AMPcyclique ; AMPK : AMP-activated Protein kinase ; CaMKIV : Calmoduline Kinase 4 ; COX : cytochrome c Oxydase ; CREB : cAMP response element binding protein ; ERR : Estrogen-related Receptor ; cGMP : Cycle Guanosine monophosphate ; MEF : Myocyte enhancer factor ; NRF : nuclear respiratory factor ; PKA : protein kinase A ; PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor ; PGC-1 $\alpha$  : PPAR $\gamma$  coactivator-1. (Scarpulla, 2008)



TFB1M, TFB2M, TFAM, mais aussi des gènes codant pour des protéines d'import, et des protéines impliquées dans l'OXPHOS (Scarpulla, 2008). La famille des PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) est impliquée dans le métabolisme des lipides. PPAR $\alpha$  et PPAR $\delta$  contrôlent l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras, PPAR $\gamma$  est exprimé majoritairement dans le tissu adipeux, où il permet la différenciation adipogénique et la biogenèse des lipides. Il active également l'expression des gènes codant pour les protéines UCP dans le tissu adipeux brun. CREB (cAMP response element binding protein), qui contrôle l'expression du cytochrome c, de Cox5a, Cox8a, l'isocitrate déshydrogénase  $\beta$ , et l'UCP1 (Scarpulla, 2008) joue également indirectement sur la biogenèse mitochondriale, et ce en activant l'expression de PGC1- $\alpha$  (PPAR $\gamma$  coactivator, un co-activateur transcriptionnel essentiel de la biogenèse mitochondriale), via l'activation de CREB par la voie de l'AMPcyclique.

Les récepteurs ERRs (estrogen related receptors  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ont des séquences de liaison à l'ADN similaires aux récepteurs à l'œstrogène. ERR $\alpha$  régule l'expression de certains gènes impliqués dans les OXPHOS, mais aussi dans l'oxydation des acides gras, dans la fusion/fission et dans l'importation des protéines mitochondriales. ERR $\alpha$  régule également la biogenèse mitochondriale d'une manière indirecte en activant l'expression de PGC1- $\alpha$ .

Deux autres facteurs de transcription également impliqués dans la biogenèse mitochondriale sont c-MYC et YY1 (Yin Yang 1). c-MYC, ayant 107 gènes mitochondriaux parmi ses gènes cibles, active également l'expression de PGC1- $\alpha$  (Kim et al., 2008). Quant à YY1, qui est activé par PGC1- $\alpha$ , il est la cible de mTOR, ce qui l'impliquerait dans un double système de senseur : PGC1- $\alpha$  étant régulé par l'état énergétique de la cellule, et mTOR par l'état nutritionnel. YY1 régule l'expression de certaines sous-unités des OXPHOS (Cunningham et al., 2007, Blattler et al., 2012).

Comme introduit précédemment, certains des acteurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale sont activés par une famille de co-régulateurs PGC (PPAR $\gamma$  coactivator-1) : PGC1- $\alpha$ , PGC1- $\beta$  et PRC (PGC-1-related coactivator).

### 3.4.2 : PGC1- $\alpha$

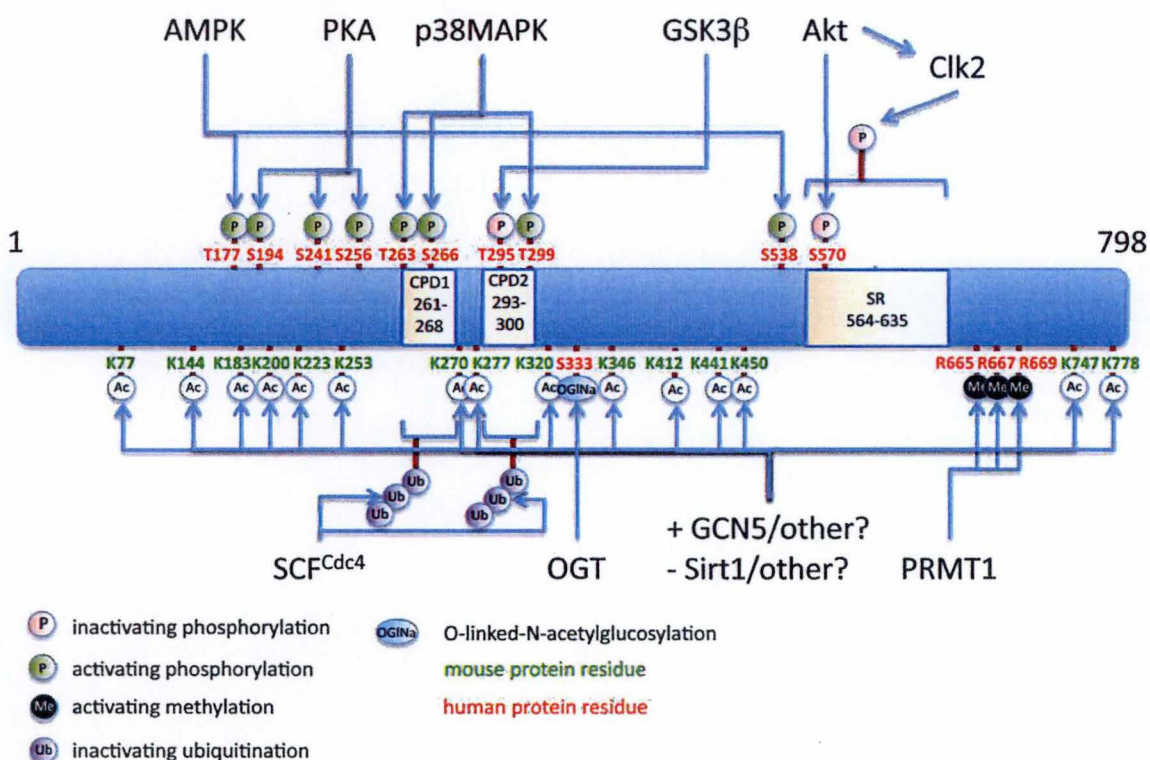
PGC1- $\alpha$  est le membre de cette famille de co-activateurs le plus documenté. Il a été défini comme le régulateur principal de la biogenèse mitochondriale, et ce en interagissant avec un certain nombre d'acteurs impliqués dans celle-ci (**Figure I.4**) Des mécanismes de régulations transcriptionnelle et post-traductionnelle de ce régulateur de la biogenèse mitochondriale ont été mises en évidence dans plusieurs situations physiologiques, telles qu'un changement de température, une augmentation du taux de glucagon ou encore un exercice physique.

Suite à un exercice physique, par exemple, la hausse de calcium cytoplasmique musculaire induit une biogenèse mitochondriale (Ojuka et al., 2002). En effet, le calcium active la protéine kinase 4  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline-dépendante (CAMKIV) et la Calcineurine A. CAMKIV phosphoryle CREB, qui, une fois activé va induire l'expression de PGC1- $\alpha$ . La Calcineurine active quant à elle MEF2C et MEF2D (Myocyte enhancer factor 2C et 2B), (Handschin et al., 2003) qui sont impliqués dans l'activation de l'expression de PGC-1 $\alpha$ . De plus MEF2 est également un facteur de transcription co-activé par PGC-1 $\alpha$ , ce qui crée une



boucle d'autorégulation positive (Michael et al., 2001, Lin et al., 2002). L'exercice induit aussi l'activation de la voie P38 MAPK, aboutissant à la phosphorylation de MEF2 et ATF2 (activating transcription factor) se liant à des éléments de réponse à l'AMPc (cAMP Response Element) permettant l'activation de l'expression de PGC-1 $\alpha$ . Un autre facteur de transcription semble jouer un rôle dans l'expression de PGC-1 $\alpha$  après l'exercice : FoxO1 (Forkhead box class-O) est inhibé suite à sa phosphorylation par Akt, lui-même activé par l'insuline.

PGC-1 $\alpha$  est également régulé par de multiples modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination, la N-acétylglucosamination ou l'acétylation (Figure I.5). Par exemple PGC-1 $\alpha$  peut être acétylé et inhibé par GCN5 (general control of aminoacid synthesis) quand les besoins énergétiques sont suffisants et déacétylé par la Sirtuine 1 quand les besoins énergétiques sont augmentés. (Pour une revue voir (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011))



**Figure I.5: Modifications post-traductionnelles de PGC-1 $\alpha$**

L'activité et/ou l'abondance de PGC-1 $\alpha$  sont régulées par des modifications post-traductionnelles. Il peut être phosphorylé (désactivé ou activé), ubiquitinylé, méthylé et glycosylé. Les modifications post-traductionnelles de PGC-1 $\alpha$  montrées concernent l'Homme (résidus en vert) et la souris (résidus en rouge) (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011).



La biogenèse mitochondriale qui vient d'être décrite semble être impliquée dans la différenciation de cellules souches embryonnaires, iPS, et somatiques. Au laboratoire, une étude récente a mis en évidence l'implication de cette biogenèse mitochondriale au cours de la différenciation hépatogénique de cellules souches, détaillons cette étude ici.

#### **4 : Caractérisation de la biogenèse mitochondriale lors de la différenciation hépatogénique**

##### *4.1 : Résultats précédant :*

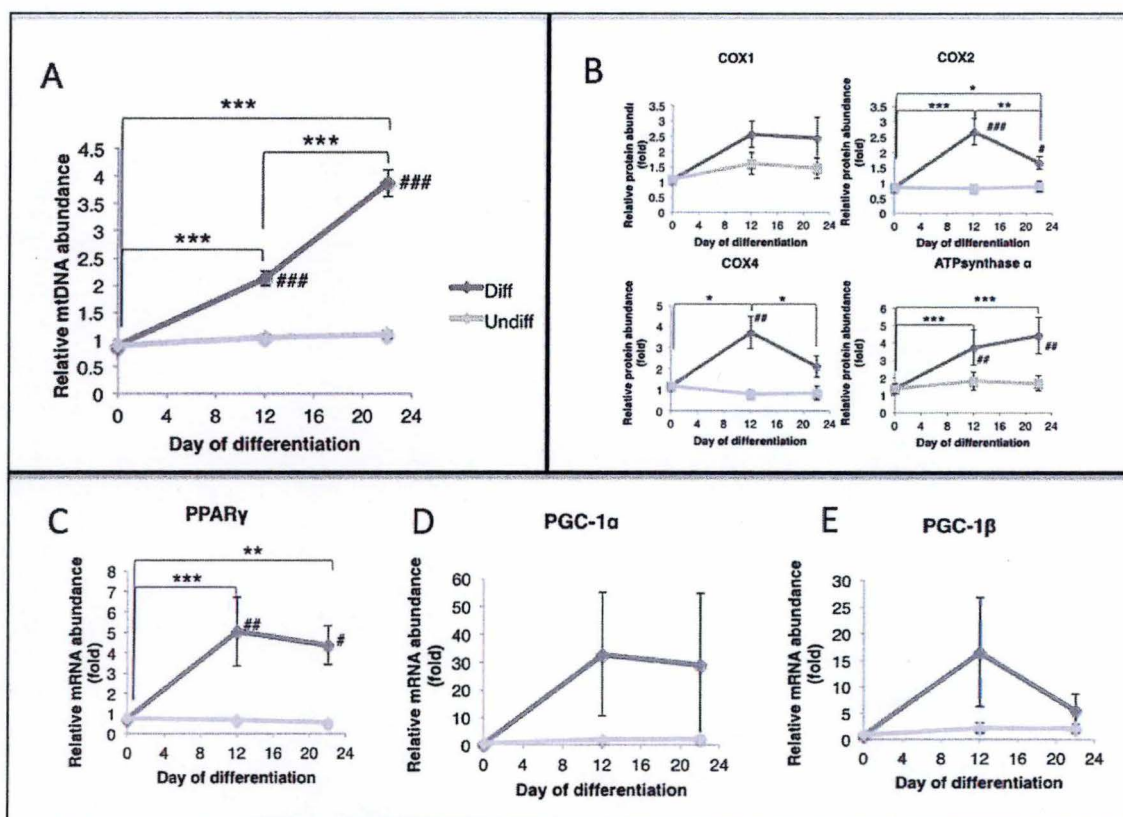
Des études antérieures menées au laboratoire ont permis de caractériser la biogenèse et les fonctions mitochondriales au cours de la différenciation hépatogénique (Wanet et al, 2014). Les principaux résultats de cette étude sont résumés à la figure I.6.). Premièrement, une biogenèse mitochondriale a été observée au cours de cette différenciation, caractérisée par une forte hausse du nombre de copies d'ADNmt/cellules (4x), une augmentation de l'abondance de certaines protéines des OXPHOS comme les sous-unités 1 et 2 de la cytochrome c oxydase (COX1 ET COX2, encodées par l'ADNmt), la sous unité  $\alpha$  de l'ATP synthase, et COX4. Un switch d'un métabolisme glycolytique à un métabolisme oxydatif a également été observé ainsi qu'une fragmentation du réseau mitochondrial.

De plus, l'abondance des transcrits de la plupart des régulateurs connus de la biogenèse mitochondriale (PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$ , PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , NRF1 et NRF2, ERR $\alpha$ , POLG1, POLG2, PolRMT, et TFAM) a été mesurée au cours de la différenciation hépatogénique. Seulement trois d'entre eux voient leur expression induite lors de la différenciation hépatogénique : PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$  et PGC-1 $\beta$  (Figure I.6). Une analyse par western blot de ces régulateurs ne met en évidence qu'une induction de PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2 et PGC-1 $\alpha$  (non montré).

Ces résultats sont surprenants dans la mesure où, au vu de la forte augmentation (x4) d'ADNmt observée au cours de la différenciation hépatogénique (Figure I.6.A), on s'attendait à des variations d'abondance de régulateurs habituellement associés à l'abondance de l'ADNmt, à savoir TFAM, POLG1 et POLG2. En effet, les variations du nombre de copies d'ADNmt sont généralement associées à des modifications de l'expression de TFAM : les souris KO pour TFAM présentent une diminution du niveau d'ADNmt, tandis que les souris surexprimant TFAM présentent une augmentation d'ADNmt (Ekstrand et al., 2004). De plus, il a également été montré que l'expression de POLG1 et POLG2 est corrélée à l'abondance d'ADNmt (Lewis et al., 2007, Di Re et al., 2009).

La cartographie des régulateurs connus de la biogenèse mitochondriale ne permettant pas d'expliquer l'augmentation d'ADN mitochondriale observée au cours de la différenciation hépatogénique, une analyse transcriptomique a été réalisée dans le but de rechercher davantage d'acteurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale d'une part, et dans la différenciation hépatogénique d'autre part (Anaïs Wanet, thèse de doctorat en cours).





**Figure I.6 : Effet de la différenciation hépatogénique sur les paramètres mitochondriaux.**

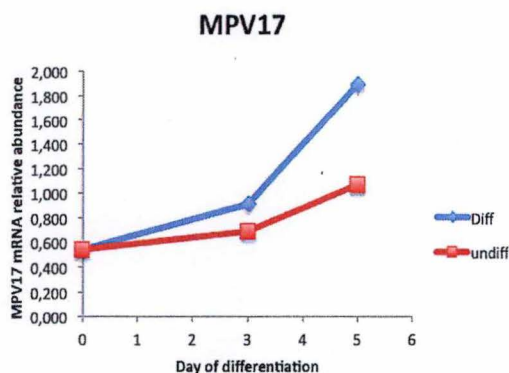
Des cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées de moëlle osseuse provenant de 3 donneurs différents ont été différenciées (gris foncé) ou non (gris clair) *in vitro* durant 22 jours en hepatocyte-like. L'abondance de l'ADNmt (A), de protéines de la chaîne respiratoire (B) ont été évaluées après 0, 12 ou 22 jours de différenciation. L'abondance des transcrits de 3 régulateurs de la biogenèse mitochondriale ont également été évalués dans les mêmes conditions : PPAR $\gamma$  (C) ; PGC-1 $\alpha$  (D) ; PGC-1 $\beta$  (E). Modifié d'après Wanet *et al.*, 2014.

Plusieurs candidats putatifs ont été sélectionnés lors de cette analyse. Premièrement, TCF7L2 (transcription factor 7-like 2), un facteur de transcription activé par la voie Wnt et impliqué dans le développement de cellules intestinales, notamment (Lee *et al.*, 1999). Deuxièmement, KLF2 (Kruppel-like factor 2) qui est impliqué dans le caractère pluripotent des cellules souches, en effet ce facteur de transcription est phosphorylé par ERK2, et quand il est phosphorylé, il est dégradé par le protéasome. Yeo et ses collègues ont montré qu'une inactivation de la kinase MEK, stabilise KLF2 qui va activer l'expression de gènes impliqués dans la pluripotence. De plus les cellules ES KLF2 $^{-/-}$  ne peuvent pas survivre plus de deux passages (Yeo *et al.*, 2014). Troisièmement, HES1 (hes family bHLH transcription factor 1) un facteur de transcription endodermal en aval de la voie Notch et réprimant l'expression de certains de ses ligands. Une délétion du gène de HES1 semble accélérer et améliorer la différenciation neuronale de cellules ES (Kobayashi *et al.*, 2009). Quatrièmement, PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) dont l'induction avait déjà été démontrée au niveau du transcrit et de la protéine (Wanet *et al.*, 2014) est un récepteur nucléaire



impliqué entre autres dans la différenciation adipogénique (Spiegelman et al., 1997), le stockage des lipides et le métabolisme du glucose. Cinquièmement, CEBP $\beta$  (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta) un facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes impliqués dans la réponse immune, mais aussi de gènes hépatiques (Jakobsen et al., 2013).

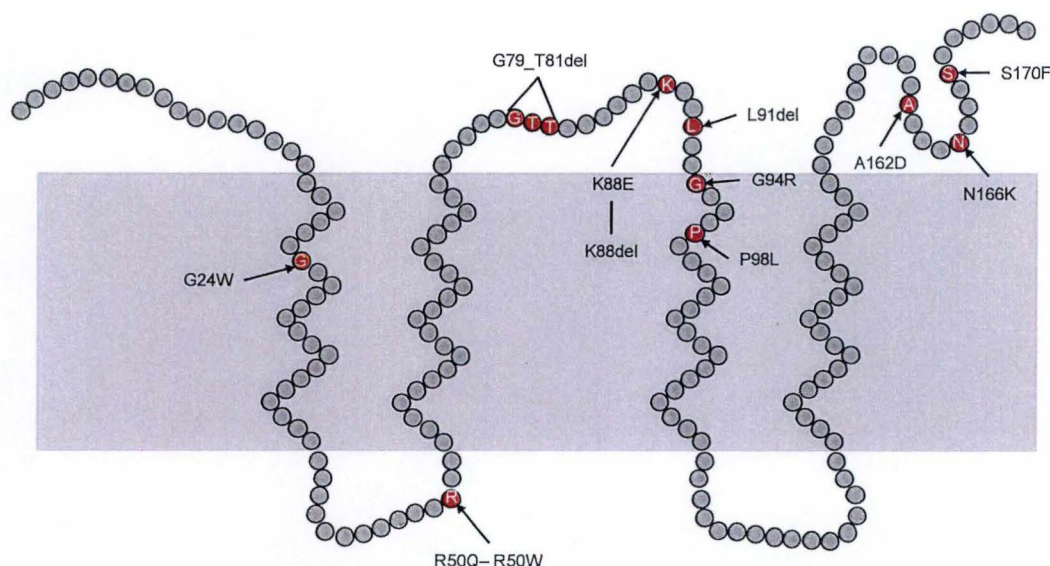
En plus de ces régulateurs transcriptionnels, une autre protéine a retenu notre attention : MPV17. L'analyse transcriptomique à haut débit a révélé une augmentation de l'abondance du transcrit de MPV17 après 3 et 5 jours de différenciation (Figure I.7).



**Figure I.7:** Abondance de transcrit de MPV17 au cours des 5 premiers jours de la différenciation hépatogénique de BM-MS (résultats obtenus par A. Wanet), ces résultats représentent l'abondance relative d'ARNm de MPV17 chez 5 donneurs.

#### 4.2 : MPV17 : une protéine impliquée dans la maintenance de l'ADNmt

MPV17 est une protéine transmembranaire de la membrane interne de la mitochondrie de 176 acides aminés et de 17 kDa. Cette protéine a longtemps été caractérisée comme étant une protéine du peroxyosome (Zwacka RM et al, 1994). En 2006, l'équipe de Spinnazolla a mis en évidence que cette protéine est en réalité une protéine de la membrane mitochondriale interne (Figure I.8). Plusieurs types de mutations, dont la plus courante est la mutation R50Q, provoquent des syndromes de déplétions en ADNmt. La déplétion en ADNmt est rencontrée dans plusieurs pathologies telles que la neurohépatopathie de Navajo, dont les symptômes se définissent par de l'ataxie, des ulcérations de la cornée, un retard de développement sexuel, des infections chroniques et des lésions hépatiques (Karadimas et al., 2006), d'autre types de syndromes de déplétion d'ADNmt (MDDS : mtDNA depletion syndrome) sont létaux après un ou deux ans. Chez l'homme, ces pathologies sont caractérisées par une diminution du niveau d'ADNmt dans les hépatocytes, les neurones, les cellules musculaires. Une région de la protéine fréquemment mutée dans ces pathologies est le résidu 80 où se trouve un motif putatif de phosphorylation de la protéine kinase C.



**Figure I.8 : Modèle de MPV17 humain et localisation des mutations courantes provoquant diverses pathologies de déplétion d'ADNmt (Lollgen and Weiher, 2015)**

MPV17 est une protéine de la membrane interne de la mitochondrie, cette protéine possède 4 domaines transmembranaires prédits. Le site putatif de phosphorylation de la Protéine Kinase C se trouve en position 80, dans une région couramment mutée dans ces maladies.

Chez 50 % des patients touchés par un MDDS, une mutation dans MPV17 a été mise en évidence, mais il existe également d'autres gènes dont des mutations peuvent provoquer un MDDS.

Si MPV17 semble fonctionnellement lié à l'ADNmt chez l'Homme, sa fonction moléculaire reste cependant inconnue. L'étude des orthologues de MPV17 chez d'autres organismes tels que la levure, la souris ou le poisson-zèbre peut nous donner des indices quant à sa fonction moléculaire.

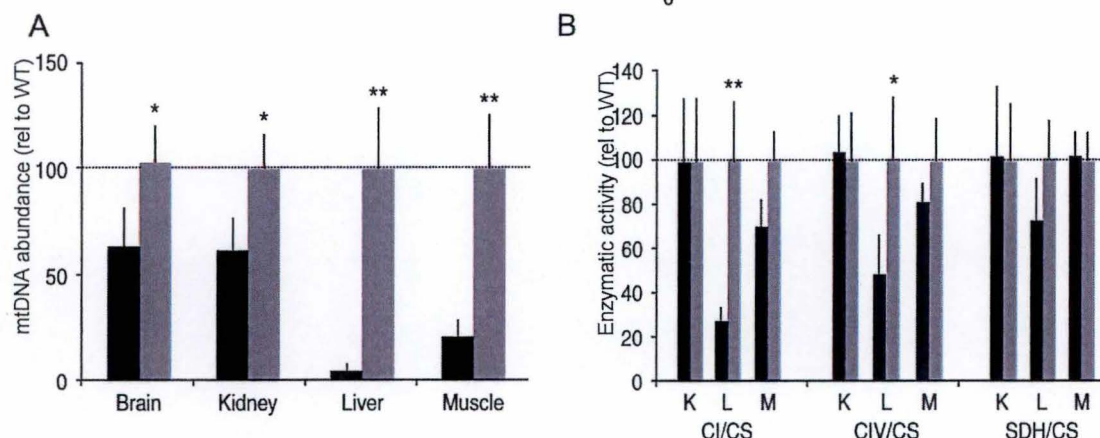
Chez la levure, quand la mutation de MPV17 la plus courante (R50Q) est reproduite dans son orthologue SYM1, celle-ci est associée à une instabilité d'ADNmt et un problème de croissance dépendant de la température (Trott and Morano, 2004, Spinazzola et al., 2006). Il a également été démontré que SYM1 est une protéine faisant partie d'un complexe de 600 kDa. Reconstituée dans une bicouche lipidique, SYM1 s'assemble en ce qui semble être un pore à cation voltage-dépendant, suggéré être impliqué dans la translocation d'intermédiaires du cycle de Krebs comme l'oxaloacétate et l'alpha-kétoglutarate (Dallabona et al., 2010, Reinhold et al., 2012).

Chez la souris, la corrélation entre la déplétion de MPV17 et la diminution d'ADNmt a également été observée. Dans un premier temps, l'équipe de Weiher a conçu une souris MPV17<sup>-/-</sup> suite à l'infection d'embryons par des rétrovirus recombinants. La mutation entraîne la mort des souriceaux suite à une insuffisance rénale après 2 à 3 mois. Cette délétion de MPV17 chez la souris se caractérise également par une perte d'audition, et une diminution de la production de ROS (Weiher et al., 1990, Meyer zum Gottesberge et al., 1996, Zwacka et al., 1994).

Par la suite, l'équipe de Spinazzola a mis en évidence dans cette lignée de souris MPV17<sup>-/-</sup> une diminution du nombre de copies d'ADNmt dans le foie, les muscles, les reins,



et le cerveau (Figure I.8.A). Cette déplétion s'accompagne d'une baisse d'activité du complexe I et du complexe IV de la chaîne respiratoire, et une légère baisse de l'activité de la succinate déshydrogénase dans le foie (Figure I.8.B) (Spinazzola et al., 2006).



**Figure I.8 : Caractérisation des souris MPV17<sup>-/-</sup> (Spinazzola et al., 2006)**

**(A) Impact de la délétion de MPV17 sur l'ADNmt** (les colonnes noires représentent les souris MPV17<sup>-/-</sup> ; les colonnes grises représentent la souche sauvage). Les résultats sont normalisés à la condition sauvage et représentent la moyenne de 5 souris MPV17<sup>-/-</sup> et 5 souris WT.

**(B) Impact de la délétion d'ADNmt sur l'activité** du complexe I (CI) ; complexe IV (CIV) et succinate déshydrogénase (SDH) normalisée par l'activité de la citrate synthase (CS), mesurée dans des homogénats de reins (K) ; foie (L) et muscles (M). Les résultats représentent la moyenne de 5 souris MPV17<sup>-/-</sup> et 5 souris WT.

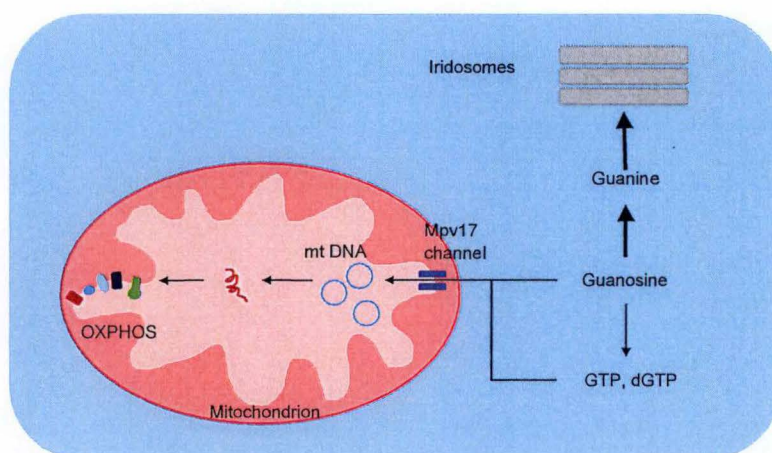
Dans une récente étude, Bottani et ses collègues ont conçu un adénovirus AAV2/8 (présentant un tropisme pour le foie) exprimant MPV17 humain sous le contrôle du promoteur de la thyroxine-binding globulin spécifique du foie, et l'ont administré à la souris MPV17<sup>-/-</sup> et la souris MPV17<sup>+/-</sup>. La restauration de l'expression de MPV17 dans le foie a permis de rétablir un taux d'ADNmt normal, ainsi que celui des transcrits encodés par l'ADNmt (mtCO1, mtCO2, ND5, ND6 & CytB). Ceci s'est également accompagné d'une augmentation de l'activité enzymatique des complexes I, III et IV. Ils ont également montré qu'un régime cétogène administré à la souris MPV17<sup>-/-</sup> provoquait de l'inflammation hépatique et une cirrhose. La restauration de l'expression de MPV17 empêcherait ces lésions (Bottani et al., 2014).

Outre cet aspect fonctionnel, cette étude a également mis en évidence que, tout comme son orthologue chez la levure SYM1, MPV17 fait également partie d'un complexe de plus de 600 kDa, celui-ci étant reconstitué après restauration de l'expression de MPV17. Il est intéressant de signaler que quand un épitope HA est ajouté à MPV17, cette protéine est incapable d'intégrer son complexe, et le phénotype reste identique au phénotype MPV17<sup>-/-</sup>. L'intégrité du complexe comprenant MP17 est donc nécessaire à la maintenance de l'ADNmt (Bottani et al., 2014).

Chez le poisson zèbre *Danio rerio*, Transparent (*tra*), un gène homologue de MPV17 humain, a également été étudié. La délétion d'une partie de *tra* est caractérisée par la perte d'iridophores (cellules pigmentées) à l'état adulte. Ces cellules sont caractérisées par une accumulation de cristaux de guanine (Lollgen and Weiher, 2015) dans un compartiment cellulaire spécifique : l'iridosome. Il a été remarqué que chez les individus mutés pour *tra*, les

rare iridophore subsistant ne présentent que très peu de ces cristaux de guanines dans leurs iridosomes. De plus, le mutant *tra* présente le même phénotype que les mutants *gart* et *paics*. *Gart* encode une enzyme avec 3 fonctions : phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, phosphoribosylaminoimidazole synthetase. *Paics* encode une enzyme bifonctionnelle : phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase. Ces enzymes sont impliquées dans la synthèse d'inosine monophosphate qui est le précurseur des purines (Krauss et al., 2013).

Ces observations suggèrent que dans les iridosomes, la guanine étant accumulée sous forme cristallisée, l'équilibre de la réaction catalysée par la purine nucleoside phosphorylase entre la guanine et la guanosine serait déplacé vers la guanine. Le pool de guanine et guanosine devenant limitant, l'équipe de Krauss a émis l'hypothèse que Transparent, l'homologue de MPV17, pourrait être un système de transport actif de dGTP ou de ses précurseurs vers la mitochondrie, pour la réplication et la transcription de l'ADNmt (Krauss et al., 2013) (Figure I.9).



**Figure I.9 : Hypothèse de l'implication de MPV17 dans le transport actif de guanosine ou de ses précurseurs dans la mitochondrie chez le poisson zèbre *Danio rario* (Lollgen and Weiher, 2015)**

Ce rôle de MPV17 comme acteur d'un pore impliqué dans l'import de nucléotides pourrait être la raison de la déplétion de l'ADNmt observée dans les différentes MDDS. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'une mutation dans le gène codant pour la déoxyguanosine kinase (GUOK), une enzyme de la matrice mitochondriale impliquée dans le maintien du pool de guanine dans la matrice mitochondriale, entraîne le même phénotype qu'une mutation de MPV17 (Mandel et al, 2001 ; El-Hattab et al ; 2010).



## **Objectifs du mémoire**

MPV17 est documenté comme une protéine insérée dans la membrane mitochondriale interne et associée à la maintenance et au nombre de copies d'ADNmt. L'induction de l'expression de MPV17 observée au début de la différenciation (Figure I.7.) et l'induction d'ADNmt observée au cours de la différenciation hépatogénique (Figure I.6 ; (Wanet et al., 2014)) nous ont fait émettre une hypothèse : l'augmentation de l'expression de MPV17 pouvait être impliquée dans l'induction d'ADNmt.

Le but de ce travail est d'une part de confirmer l'induction de l'expression de MPV17 lors de la différenciation hépatogénique tant au niveau du transcrit qu'au niveau protéique, et d'autre part de déterminer si MPV17 joue effectivement un rôle dans l'induction de mtDNA lors de cette différenciation, et son implication éventuelle dans la différenciation hépatogénique.

Afin d'investiguer cette hypothèse, deux stratégies de modulation de l'expression de MPV17 ont été mises au point : l'invalidation et la surexpression de MPV17. Cette modulation de l'expression de MPV17 nous a permis d'étudier quel était son impact sur l'abondance d'ADNmt au cours de la différenciation hépatogénique de BM-MSC, mais également son impact sur l'abondance de transcrits de plusieurs marqueurs hépatogéniques et mésenchymateux. Pour terminer, nous avons investigué l'impact de cette modulation de MPV17 sur la prolifération de cellules souches mésenchymateuses

# Matériel et méthodes



## **II: Matériel et méthodes**

### **Cultures cellulaires**

Les cellules souches mésenchymateuses humaines de moelle osseuse (Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells : BM-MSc) ont été isolées à l'institut Jules Bordet, avec l'accord de patients sains. Ces cellules ont été généreusement offertes par Mehdi Najar, laboratoire de Thérapie Cellulaire Clinique, Institut Jules Bordet, ULB.

Dans la phase d'expansion, les BM-MSc sont cultivées dans du DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) avec 1g/L de glucose, 10% de sérum fœtal bovin (FBS) et 1% de pénicilline/streptomycine (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Ces cellules sont ensemencées à une confluence de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>, et sont repiquées tous les 3 ou 4 jours.

Les cellules souches mésenchymateuses de cordon ombilical (Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells : UC-MSc) ont été isolées à partir de la gelée de Wharton, à l'Institut Jules Bordet, et généreusement offertes par Mehdi Najar (Laboratoire de Thérapie Cellulaire Clinique, Institut Jules Bordet, ULB). Durant la phase d'expansion, ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que les BM-MSc.

Les cellules progénitrices du foie humaines (ADH-LSC : Adult Derived Human Liver Stem Cells) ont été généreusement offertes par le Dr Mustapha Najimi (Institut de Recherche Clinique et Expérimentale, Laboratoire d'hépatologie pédiatrique et de thérapie cellulaire, UCL). Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM sans pyruvate et dans des boîtes T75 préalablement coatées au collagène (5µg/cm<sup>2</sup>) de type 1 de queue de rat (#354236, Corning, MA, USA).

### **Différenciation hépatogénique des BM-MSc**

Les cellules en expansion sont ensemencées à une densité de 8000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des boîtes T75 préalablement coatées au collagène (5µg/cm<sup>2</sup>) de type 1 de queue de rat (#354236, Corning), et les cellules sont différenciées une fois qu'une confluence de 95% est atteinte (D0). Toutes les différenciations ont été effectuées sur des cellules à passage entre 5 et 7.

Le modèle de différenciation hépatogénique utilisé *in vitro* dure 22 jours et se répartit en 3 étapes. Pendant la première étape de 48 heures, le milieu IMDM (Iscove's Modified Dubecco's Medium) + 1 % de pénicilline/streptomycine est supplémenté d'EGF 20 ng/ml (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), FGF-2 10 ng/ml (PeproTech). Durant la deuxième étape de différenciation durant 10 jours, le milieu est supplémenté d'HGF 20 ng/ml, Nicotinamide 0,61 g/l (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), insulín-transférin-sélénium 1x (Life Technologies). Le milieu est renouvelé après 3 et 7 jours. Pendant la troisième étape, le milieu

est supplémenté par de l'Oncostatine M 20 ng/ml (PeproTech), de la dexaméthasone 1  $\mu$ M (Sigma-Aldrich) et de l'insulin-transferrin-selenium 1x.

Parallèlement, la condition appelée « cellules non différenciées » correspond à des cellules BM-MSC ensemencées dans les mêmes conditions que la condition « cellules différenciées », sur des boîtes recouvertes de collagène. Elles sont cultivées pendant 22 jours dans le milieu IMDM, 1% de FBS et 1 % de pénicilline/streptomycine sans cocktail de différenciation.

### Quantification de l'abondance relative d'ARNm par qRT-PCR

L'ARN a été extrait en utilisant le kit « RNeasy mini kit » et le Qiacube (Qiagen, Venlo, Netherlands). La rétro-transcription a été réalisée en utilisant le kit « Transcription First Strand cDNA synthesis kit » (Roche, Applied Science, Penserger, Germany). Pour la qRT-PCR, le transcrit utilisé pour la normalisation (gène de ménage) est celui de PPIE (Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase E). Les séquences des amorces utilisées sont indiquées en tableau I.1. Le mix de réaction utilisé pour la PCR quantitative contenait l'ADNc dilué 50x, 2  $\mu$ l d'eau déminéralisée, 2  $\mu$ l de primer F et 2  $\mu$ l de primer R, 12  $\mu$ l de SYBRGreen PCR master mix (ROCHE), et a été analysé sur un système ViiA™ 7 Real-Time PCR (Life Technologies). Les résultats sont exprimés en terme de fold d'induction du gène d'intérêt normalisé par rapport à l'expression du housekeeping gene ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) où  $\Delta Ct = Ct$  du gène d'intérêt -  $Ct$  du housekeeping gene, et  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{condition\ testée} - \Delta Ct_{condition\ expansion}$ . La significativité a été déterminée par une ANOVA 2 paillée, supplémentée d'un test de Student-Newmans-Keuls, en utilisant le logiciel Sygmatstat 3.2 (Systat, San Jose, CA, USA).

Gene	Primer F	Primer R
POLG	TGGCCTTGACAGATCACCAACCT	TCCTTCCTGAGGCACCGGTCAA
PolRmt	GTGTACGGGGTCACGCGCTA	CCGAGAACATCTCCTGTAGACTCTT
Beclin (gène)	CCCTCATCACAGGGCTCTCTCCA	GGGACTGTAGGCTGGGAACATATGC
ND2 (gène)	TGTTGGTTATACCCTTCCCGTACTA	CCTGCAAAGATGGTAGAGTAGATGA
SOX9	CACACAGCTCACTCGACCTTG	TTCTTCGGTTATTTTTAGGATCATCTC
Albumin	TGTTGCATGAGAAAACGCCA	GTCGCCTGTTACCAAGGAT
POLG2	TCGACTCCAGTGGTGAGAAA	TTCTTTCCGGCCTTCTTCAT
Alpha1-antitrypsine	GGGTCAACTGGGCATCACTAA	CCCTTTCTCGTCGATGGTCA
MpV17	GCTCAGGAAGCATGGCACTCT	AATGTCACCCAGGCCCATCA
mtCO1	CCTGACTGGCATTGTATTAGC	TTTTGGCGTAGGTTTGGTCT
mtCO2	AGATGCAATTCCCGGACGT	CATGAAACTGTGGTTTGCTCC
KLF4	CCGCCGCTCCATTACCAAG	TCGTCTTCCCTCTTTGGCT
NT5E	TCGCCCATTGATGAACGCAA	CGACACTGGTGCAAAGAACA
TDO2	GAGGAACAGGTGGCTGAATTT	GCTCCCTGAAGTGCTCTGTA

Tableau II.1: Amorces utilisées en PCR quantitative



### Quantification par q-PCR de l'ADN mitochondrial (ADNmt)

L'ADN total a été extrait en utilisant le kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Le mix de réaction est similaire à celui décrit au point précédent pour la qRT-PCR pour l'ARN, mais avec une quantité de 13,32 ng d'ADN par condition. Nous avons utilisé des amorces ciblant ND2 (sous-unité 2 de la NADH déshydrogénase, un gène mitochondrial) et nous avons normalisé en utilisant le gène de la Becline (gène nucléaire). Les résultats sont exprimés en terme de nombre de copies d'ADNmt =  $2^{2^{-\Delta Ct}}$ , où  $\Delta Ct = Ct_{\text{moyen ND2}} - Ct_{\text{moyen Becline}}$ .

### Extraction protéique

Les cellules ont été trypsinisées et centrifugées à 200 g pendant 5 minutes. Les culots ont été conservés à -80°C avant d'être plus tard lysés par un tampon « RIPA » (NP40 1% ; SDS 0.1% ; Sodium deoxycholate 1% ; NaCl 150 mM ; Tris-HCl pH 7,6 25 mM ; Complete Protease inhibitor Cocktail 4% (Roche), 4% phosphatase inhibitor cocktail (25mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> ; 250 mM 4-nitrophenylphosphate ; 250 mM glycerophosphate ; 125 mM NaF)). Les lysats ont été agités sur roue 30 minutes à 4°C, après quoi ils ont été soniqués 3x10 secondes et centrifugés 15 min à 15700 g à 6°C. Le surnageant a été collecté et la concentration en protéines a été dosée grâce au dosage de Pierce (Thermo Scientific ; USA) supplémenté d'IDCR (Ionic Detergent Compatibility Reagent), rendant cette technique de dosage compatible avec le tampon de lyse contenant du SDS.

### Western blot

25 µg de protéines ont été résolues par électrophorèse sur un gel précoulé 4/20% Mini-Protean TGX (Biorad, Hercules, CA, USA). Un transfert liquide a été réalisé sur une membrane immobilon (Millipore, Billerica, MA, USA). Un tampon de blocage Odyssey (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) a été utilisé pour bloquer la membrane. Un anti-corps anti-MPV17 (Cat 10310-1-AP, Proteintech, IL, USA) 1:500 a été incubé une nuit à 4°C. L'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin, Li-Cor) 1:10000 a été incubé une heure à température ambiante. La membrane a été scannée par un Scanner Li-Cor Odyssey, et les résultats ont été analysés visuellement mais aussi quantifié en utilisant le logiciel Odyssey. La fluorescence la bande correspondant à MPV17 a été normalisée à la fluorescence correspondant à la détection du contrôle de charge Histone 3.

### Immunofluorescence

Les BM-MSC ont étéensemencées à une confluence de 20000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des couvre-objets coatés au collagène. Le jour suivant, les cellules ont été fixées avec du paraformaldehyde 4%, avant d'être perméabilisées avec du PBS + Triton 1%. L'anticorps primaire dirigé contre MPV17 (Cat 10310-1-AP, Proteintech, IL, USA) et TOM20 (612278,



Transduction laboratories/BD) dilués 100 fois ont été incubés durant la nuit à 4°C. Les anticorps secondaires utilisés sont un anti-IgG de lapin (pour MPV17) et un anti-IgG de souris (pour TOM20) couplés à un Alexa (Molecular Probes) et dilués 1:10000. L'immunomarquage a été observé à l'aide d'un microscope confocal (Leica microsystem).

### **Construction d'un plasmide lentiviral de surexpression de MPV17**

L'ARNm de MPV17 a été rétro-transcrit en utilisant le kit Transcription First Strand cDNA synthesis kit (Roche) grâce à une amorce spécifique de MPV17 (5'-AGGTGGAAACGATGGAGTGA-3'). L'ADNc a été amplifié par PCR en utilisant un primer F contenant un site de restriction pour BamH1 (5'-AGGATCCAGGAAGCATGGCA-3'), et un primer R contenant un site de restriction pour SalI (5'-AGTCGACGGCAGGCTTAGA-3'). Le produit PCR a été ligué dans un plasmide intermédiaire pSKoriTKan restreint par EcoRV en utilisant une T DNA ligase (Promega). Des *Escherichia coli* BL21 ont été transformées par ce plasmide intermédiaire, et un test blanc/bleu a été réalisé. Les plasmides pSKoriTKAN-MPV17 des colonies sélectionnées ont été extraits en utilisant le kit « DNA prep Spin Miniprep kit » (Quiagen). Un séquençage et une restriction diagnostique ont permis de mettre en évidence l'intégrité du plasmide.

1 µg de plasmide intermédiaire pSKoriTKan-MPV17 et de plasmide lentiviral pLenti-PGK-GFP-puro (Addgene, Cambridge, MA, United Kingdom) ont été restreints par 1 µl de BamH1, auquel a été ajouté le tampon de restriction de BamH1 dans un volume total de restriction de 20 µl. Les plasmides ont été restreints 2h à 37°C, avant d'inactiver la restriction par une incubation de 15 minutes à 65°C. Les plasmides ont ensuite été restreints par 1 µl de SalI, supplémentés de 8 µl d'eau, 2 µl de tampon de BamH1 et de 10 µl de NaCl 675 mM (permettant de mimer le tampon optimal de SalI). La restriction a duré 2h à 37°C avant d'être arrêtée par une incubation de 15 minutes à 65°C. Les produits de restriction ont alors migré sur un gel d'agarose 1% (pour l'insert MPV17) et 0,7% (pour pLenti-PGK-GFP-puro restreint), les bandes d'intérêts ont été découpées et purifiées en utilisant le kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Après dosage, le plasmide restreint a été déphosphorylé avec de la phosphatase alcaline. L'insert MPV17 et le plasmide restreint ont été ligués avec un ratio 3:1.

### **Vecteurs lentiviraux de répression de MPV17**

Les vecteurs de répression de MPV17 utilisés sont les pLKO.1-puro encodant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17, Sigma SHCLNG-NM\_002437), et un pLKO.1-puro encodant un shRNA sans cible (shNT, Sigma SHC016-1EA).

### **Transformation d'E.Coli compétentes et PCR sur colonies**

Une souche d'*E.coli* STBL3 (Invitrogen) a été transformée avec ce plasmide lentiviral. Des colonies résistantes à l'ampiciline ont été sélectionnées et placées dans 40 µl d'eau. Chaque réaction d'amplification comprenait 4 µl de Green goTaq buffer, 0.8 µl de mix dNTP 20 mM (Eurogentec, Seraing, Belgique), 0.37 µl de primers forward et reverse 27 µM, 9.76 µl d'eau, 0.1 µl de GoTaq DNA polymérase (Promega) et 5 µl de bactéries diluées (une colonie



dans 40 µl d'eau). Le programme PCR utilisé pour MPV17 commence par 5 minutes de dénaturation à 95°C, suivi de 35 cycles de 30 secondes de dénaturation à 98°C, 30 secondes d'hybridation à 53°C, 45 secondes d'extension à 72°C. Le programme se termine par 5 minutes d'élongation à 72°C, et un refroidissement à 4°C. Les produits PCR ont migré sur un gel d'agarose 0.9% en présence de bromure d'éthidium, et les clones ayant les bandes de tailles attendues ont été amplifiés par une culture liquide de LB + ampiciline une nuit à 32°C dans un incubateur à 225 RPM. Le jour suivant, les plasmides ont été extraits avec le kit « DNA Prep Spin Miniprep kit » (Quiagen). Un séquençage et une restriction diagnostique ont été réalisés pour mettre en évidence l'intégrité du plasmide.

### **Transfection de cellules HEK-293T avec le vecteur de répression/surexpression de MPV17**

Le premier jour, les cellules HEK-293T ont étéensemencées à une confluence de  $4.10^6$  cellules/boîte T75 dans du DMEM 4,5 g/l de glucose (DMEM-HG), 2mM de L-glutamine et 10% de sérum bovin. Les cellules HEK-293T ont été transfectées au jour 2. Pour une boîte T75, la composante ADN du mélange de transfection contient 4 µg de construction plasmidique (pLenti-MPV17-puro ou pLKO.1-puro encodant le shMPV17), 0.4 µg de plasmide pCMV-VSVG (Addgene #8454), 3.6 µg de plasmide psPAX2 (Addgene #12260) dans 240 µl d'opti-MEM (Invitrogen). La lipofectamine a été diluée à raison de 16 µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen) dans 240 µl d'opti-MEM. Le mélange de transfection a été préparé en mélangeant l'ADN et la lipofectamine diluée, incubé 30 minutes à RT et ajouté aux cellules pendant 18 heures à 37°C. Au jour 3, le DMEM-HG a été remplacé par du DMEM 1g/l de glucose, 10% de FBS et 1% de mixture pénicilline/streptomycine (milieu des cellules souches mésenchymateuses à transduire). Le milieu a été renouvelé au jour 4, et le surnageant contenant les lentivirus a été conservé à 4°C. Au jour 5, le milieu a été collecté et poolé avec celui du jour 4, et enfin filtré avec un filtre 0.45 µm. Les particules virales ont été titrées avec le kit « Lentivirus qPCR titer kit » (Applied Biological Materials Inc ; Richmond ; BC ; Canada).

### **Transduction de BM-MSC avec des lentivirus**

Au jour 1, les cellules souches mésenchymateuses ont étéensemencées à 6000 cellules/cm<sup>2</sup> dans du DMEM 1g/l de glucose, 10% de FBS, 1% de pénicilline/streptomycine. Au jour 4, les cellules ont été transduites avec  $121,9 \cdot 10^6$  lentivirus/boîte T175, avec 60 µg/ml de protamine sulfate. Pour la stratégie de répression, les cellules ont été transduites avec les lentivirus encodant le shMPV17, le shNT (sans cible), ou ont été laissées non transduites. Pour la stratégie de surexpression, les cellules ont été transduites avec des lentivirus surexprimant MPV17 ou la GFP comme contrôle. Un jour après le début de la transduction, les lentivirus ont été enlevés. Après 3 jours, une sélection avec de la puromycine a été réalisée. Trois jours après le début de la sélection puromycine, les cellules ont étéensemencées dans des boîtes T75 à une confluence de 8000 cellules/cm<sup>2</sup>. Une fois les cellules confluentes, la différenciation hépatogénique a commencé (= jour 0 de la différenciation). Des échantillons

ont été analysés aux jours 0, 12, et 22 dans la condition différenciée et non différenciée (Figure II.1).

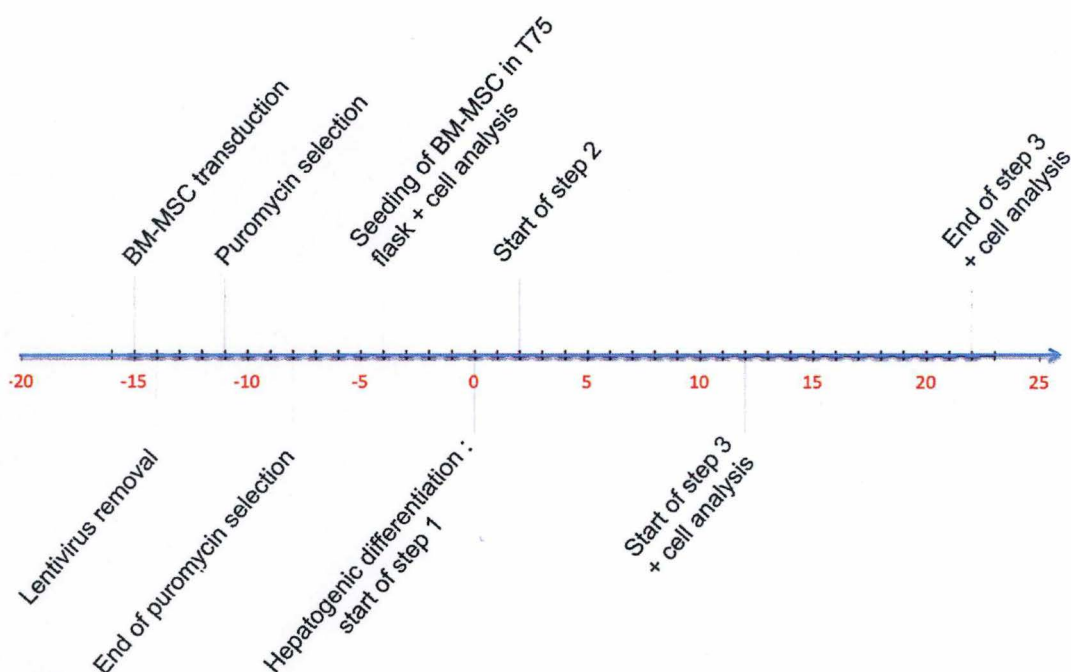


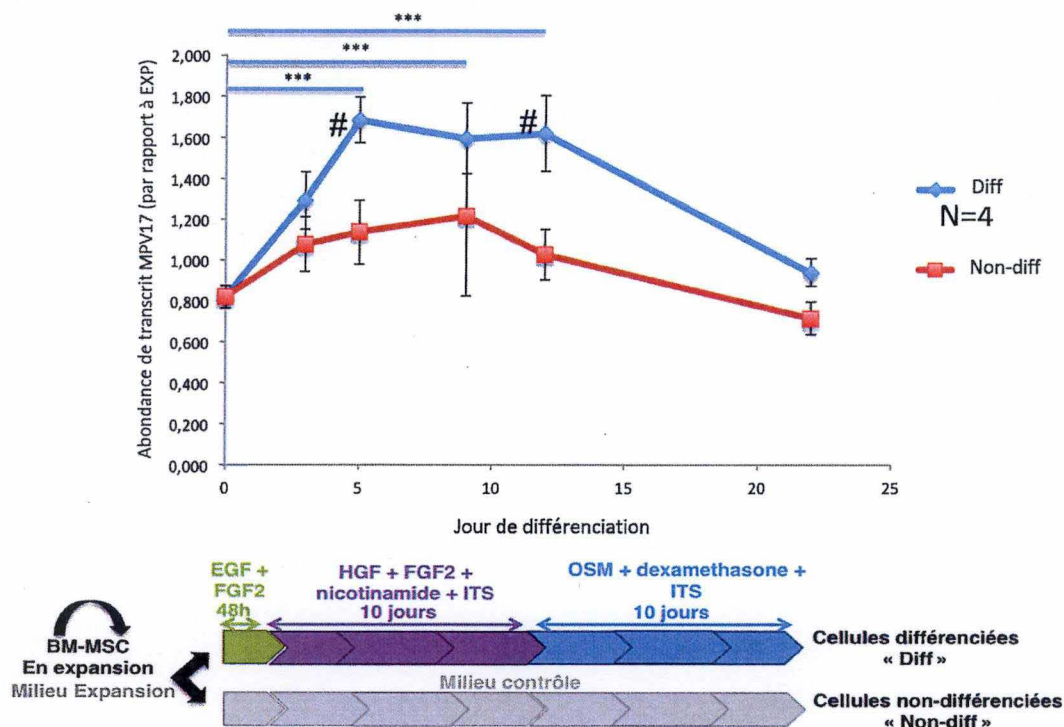
Figure II.1 : Ligne du temps retraçant la transduction et de la différenciation hépatogénique de cellules souches mésenchymateuses.

### Test de prolifération

A la fin de la sélection puromycine, les cellules ont étéensemencées dans des puits de plaques 24 puits à une confluence de 4000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules ont alors été fixées avec du paraformaldéhyde (4%) au jour 1, au jour 4 et au jour 8 (pour la stratégie de répression), et aux jours 1, 4 et 6 (pour la stratégie de surexpression). Les cellules ont alors été traitées à l'Hoeschst 1 µg/ml, et un nombre de cellules par unité de surface été mesuré par un microscope inversé à fluorescence (BD Pathway 855, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

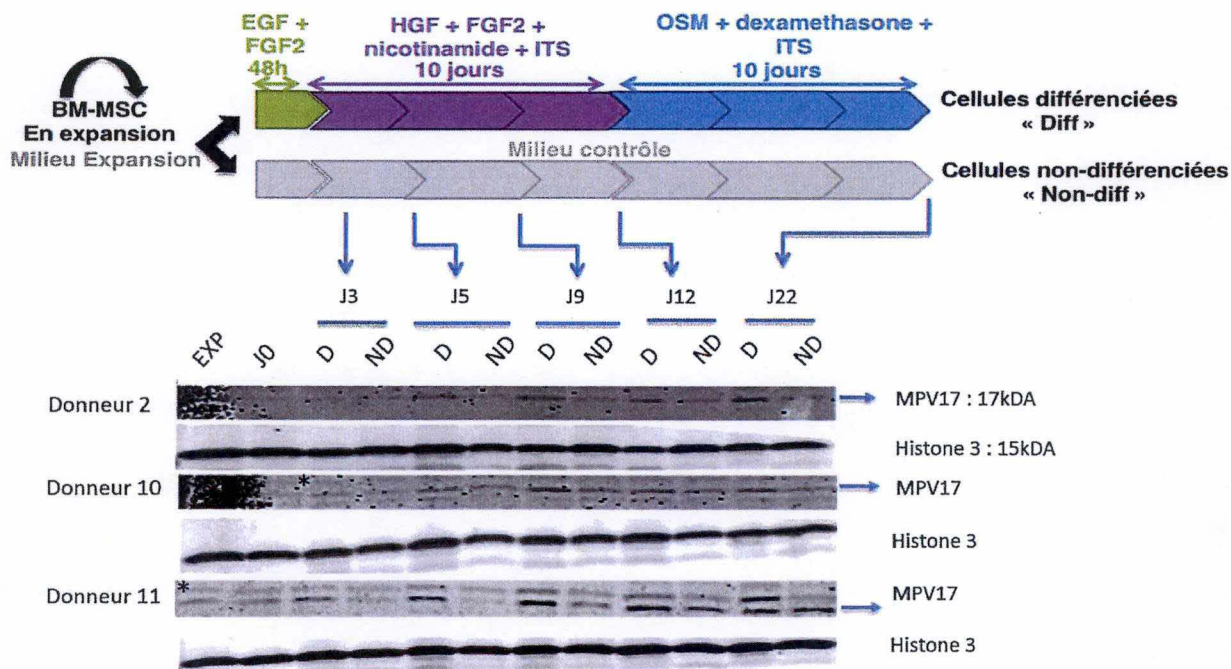


## Résultats et discussion



**Figure III.1 : Abondance relative du transcrit de MPV17 durant la différenciation hépatogénique.**

Les cellules souches mésenchymateuses de 4 donneurs différents ont été différenciées (Diff), ou laissées non-différenciées (Non-diff) comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les cellules ont été lysées après 0, 3, 5, 8, 12 et 22 jours de traitement. L'ARN a été extrait, et l'abondance relative du transcrit de MPV17 par rapport au gène de ménage PPIE a été mesurée par qRT-PCR. Les résultats sont exprimés en terme de "fold d'induction" par rapport aux cellules en expansion. Les données représentent la moyenne de 4 donneurs  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne. La significativité a été déterminé par une ANOVA 2 paillée supplémentaire par une analyse student-Newman-Keuls. \* Représente la significativité entre les différents jours chez les cellules différenciées. # Représente la significativité entre les états différencié et non différencié à un jour donné.



**Figure III.2 : Abondance protéique de MPV17 au cours de la différenciation hépatogénique**

Les BM-MSc de 3 donneurs ont été différenciées (D) ou laissées non-différenciées (ND). Les protéines ont été extraites après 0, 3, 5, 9, 12 et 22 jours de différenciation hépatogénique et analysées par western blot pour détecter l'abondance de MPV17. L'abondance d'histone 3 a été révélée et sert de contrôle de charge.

\* représentent des bandes aspécifiques.



### **III : Résultats et discussion**

#### **1 : Validation de l'induction de MPV17 lors de la différenciation hépatogénique**

##### *1.1 : Abondance relative de transcrit MPV17 au cours de la différenciation hépatogénique*

L'analyse transcriptomique effectuée par Anaïs Wanet après 0, 3 et 5 jours de différenciation a démontré une induction d'expression de MPV17 (Figure I.10). La première étape de ce mémoire a été de vérifier les variations de l'expression de MPV17 durant la différenciation hépatogénique. Pour ce faire, les BM-MSD dérivées de 4 donneurs différents ont été différenciées en hepatocyte-like, et l'abondance relative du transcrit de MPV17 a été évaluée par qRT-PCR (Figure III.1). Une augmentation d'expression est observée dans la condition différenciée, avec un pic au cinquième jour de la différenciation, persistant jusqu'au jour 12 et ensuite une diminution progressive. Par rapport à la condition expansion, l'abondance du transcrit de MPV17 est significativement plus élevée après 5, 8 et 12 jours de différenciation. Elle est également significativement plus élevée que la condition « non différenciée » aux jours 5 et 12. Enfin, bien que les cellules non différenciées présentent aussi une augmentation de l'expression de MPV17 au cours du temps, celle-ci n'est pas significativement différente de la condition « expansion ».

##### *1.2 : Abondance protéique de MPV17 au cours de la différenciation hépatogénique*

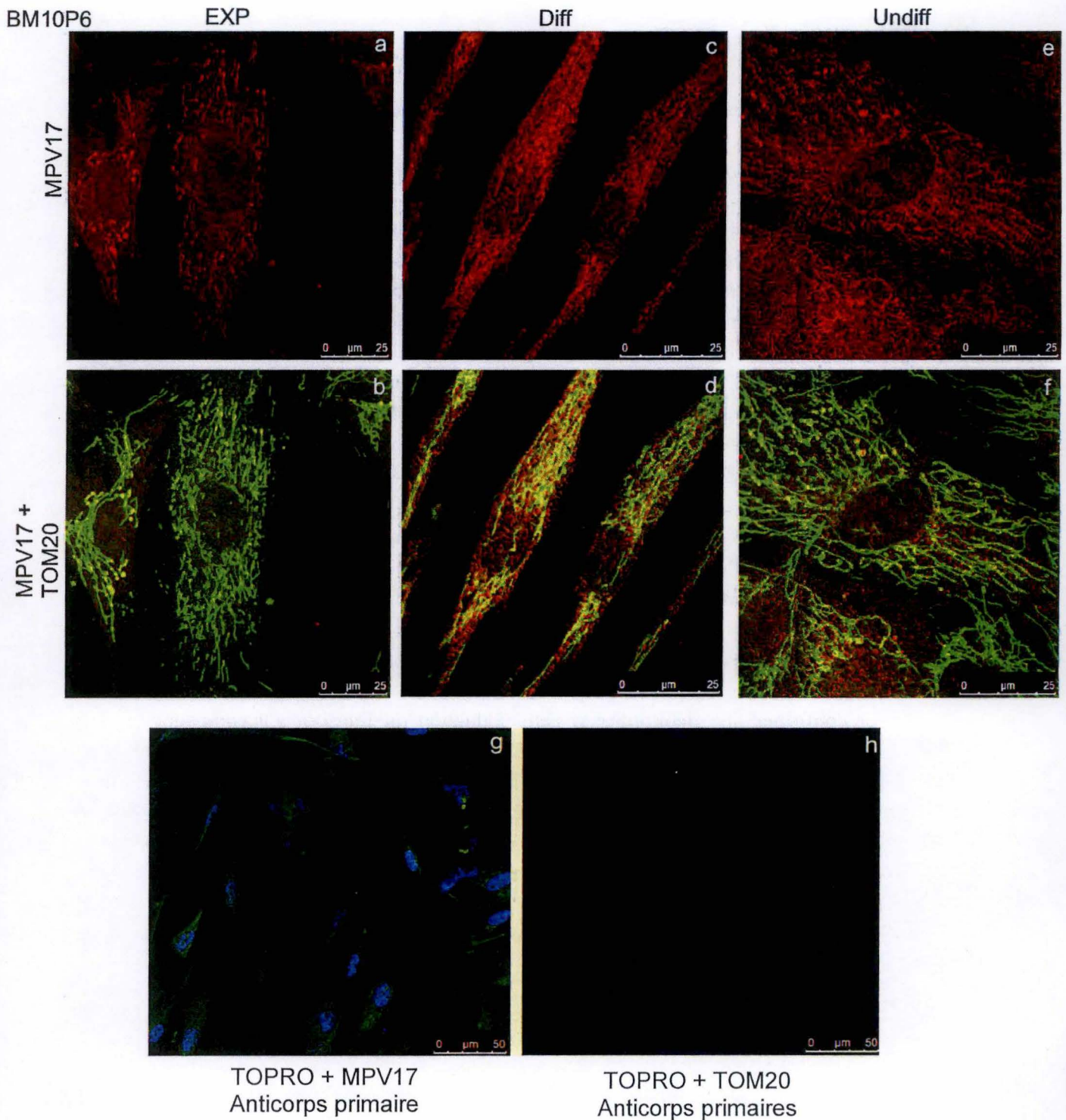
Pour confirmer que déterminer si cette induction du transcrit s'accompagne d'une augmentation du niveau protéique, les BM-MSD de 3 donneurs ont été différenciées ou laissées non-différenciées, les protéines ont été extraites et MPV17 a été révélé par Western-blot (Figure III.2). Bien que l'anticorps révèle un signal de faible qualité, une bande correspondant à MPV17 semble augmenter au cours de la différenciation, et ce de manière plus intense dans les puits correspondant aux cellules différenciées que dans ceux correspondant aux cellules non-différenciées.

Ces résultats confirment donc l'induction d'expression de MPV17 observée lors de l'analyse transcriptomique.

#### **2 : Localisation sub-cellulaire de MPV17**

Comme détaillé dans l'introduction, de nombreux éléments suggèrent une relation entre l'ADNmt et MPV17. Dans le but d'investiguer une possible co-localisation de ces deux derniers, et de confirmer la localisation subcellulaire de MPV17, une analyse en microscopie par immunofluorescence a été optimisée (Figure III.3). Des BM-MSD ont été fixées en expansion (Exp), laissées non-différenciées (Non-diff) ou différenciées (Diff) durant 12 jours, cette durée semblant correspondre au niveau protéique le plus élevé de MPV17 comme le suggère la figure III.2. MPV17 et TOM20 (transporter of the outer membrane 20 kDa, une protéine impliquée dans la translocation de protéines dans la mitochondrie) ont été immunomarqués. Étant donné la faible qualité de l'anticorps anti-MPV17, beaucoup de bruit





**Figure III.3 : Localisation subcellulaire de MPV17 par immunofluorescence.** Les BM-MSC ont été différenciées pendant 12 jours, fixées et immunomarquées : TOM20 (Vert) ; MPV17 (Rouge). (a;b) BM-MSC en expansion ; (c ; d) Cellules différenciées durant 12 jours ; (e ; f) Cellules non-différenciées ; (g ; h) Contrôles négatifs des anticorps secondaires réalisés sur des cellules en expansion avec du TOPRO + l'anticorps anti-MPV17 (g) et du TOPRO+ l'anticorps anti TOM20.



de fond est observé, néanmoins les données obtenues démontrent une co-localisation de MPV17 et TOM20, ce qui confirme, dans des cellules souches mésenchymateuses, la localisation mitochondriale de MPV17 préalablement observée dans des cellules HeLa et des cellules COS7 par l'équipe de Spinazzola (Spinazzola et al., 2006).

### **3. Effets de la modulation de l'expression de MPV17 sur le phénotype mitochondrial au cours de la différenciation hépatogénique**

De nombreux éléments, détaillés au point 4.2 de l'introduction, démontrent la corrélation entre l'expression de MPV17 et le maintien et le nombre de copies d'ADNmt. D'autre part, il a été montré que la différenciation hépatogénique de cellules souches mésenchymateuses est caractérisée – entre autre – par une augmentation de l'abondance d'ADNmt (Wanet et al., 2014). Or, cette même différenciation hépatogénique est également accompagnée d'une augmentation d'abondance du transcrit de MPV17. Afin de mettre en évidence une éventuelle relation de cause à effet entre l'induction de MPV17 et l'augmentation de l'ADNmt observées au cours de la différenciation hépatogénique, nous nous avons voulu moduler l'abondance de MPV17, par le biais d'une invalidation, dans un premier temps, et d'une surexpression dans un deuxième temps. L'objectif était de mesurer l'impact de ces modulations sur l'abondance de l'ADNmt et sur la différenciation hépatogénique de BM-MSC.

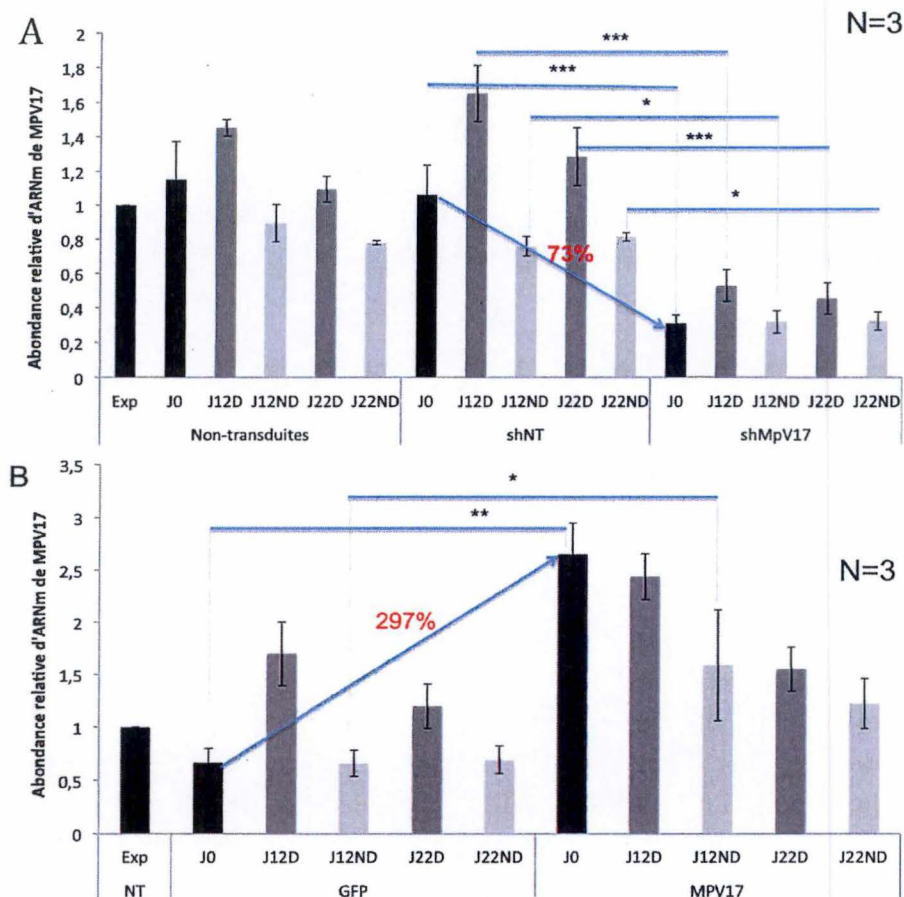
Afin d'invalider/surexprimer MPV17 tout au long de la différenciation, une stratégie de transduction par lentivirus a été mise en place. Le plasmide permettant d'invalider l'expression de MPV17 à l'aide d'un shRNA a tout d'abord été construit, ainsi que celui permettant la surexpression de cette protéine (voir Matériel & Méthodes). La figure II.1 résume le protocole mis au point pour transduire les BM-MSC en expansion avec les particules lentivirales, sélectionner les cellules transduites sur base de leur résistance à la puromycine, et puis les ensemercer afin de les soumettre aux 22 jours de différenciation hépatogénique.

Au cours de ce mémoire, nous avons eu le temps d'effectuer l'ensemble des analyses sur des cellules souches issues de 3 donneurs différents et invalidées pour l'expression de MPV17. Par contre, toutes les analyses relatives à la stratégie de surexpression de MPV17 n'ont pas pu être réalisées, par manque de temps. Nous avons néanmoins choisi de présenter en parallèle les résultats associés à l'invalidation et à la surexpression de MPV17. La première étape a été de déterminer l'efficacité de modulation de l'expression de MPV17.

#### *3.1 : Efficacité de l'invalidation de MPV17*

Les cellules ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17, un shRNA sans cible, ou ont été laissées non transduites. Une fois transduites et sélectionnées grâce à leur résistance à la puromycine, ces cellules ont été différenciées ou laissées non-différenciées.

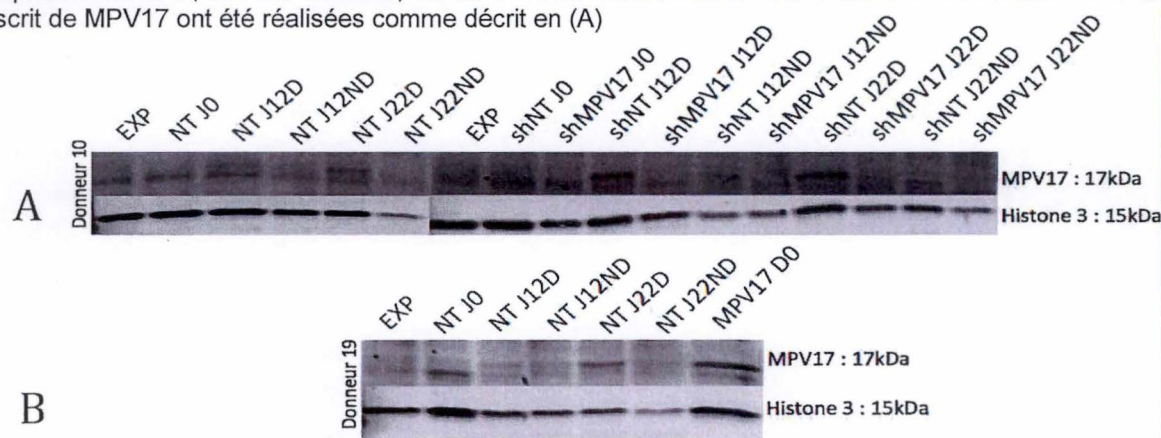




**Figure III.4 : Evaluation de l'efficacité de l'invalidation/la surexpression de MPV17 au niveau du transcrite.**

**(A) Efficacité de l'invalidation** : Les BM-MSC de 3 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), par des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17), ou laissées non-transduites (NT). Après transduction, ces cellules ont été différenciées (D) ou laissées non différenciées (ND) comme décrit dans la section Matériel & Méthodes. Les cellules ont été lysées dans la condition expansion (Exp), et après 0, 12 et 22 jours de (non) différenciation. L'ARN a été extrait, et l'abondance relative du transcrite de MPV17 par rapport au gène de ménage PPIE a été mesurée par qRT-PCR. Les résultats sont exprimés en terme de « fold d'induction » comparé à la condition expansion. Les données représentent la moyenne de 3 donneurs +/- l'erreur standard à la moyenne. La significativité a été déterminée par une ANOVA 2 paillée supplémentaire par un test de Student-Newman-Keuls. \* Représente la significativité entre les deux conditions de transduction.

**(B) Efficacité de surexpression** : Les BM-MSC de 3 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus surexprimant la GFP, comme contrôle, ou MPV17. La différenciation des cellules et l'évaluation de l'abondance du transcrite de MPV17 ont été réalisées comme décrit en (A)



**Figure III.5: Efficacité de l'invalidation/la surexpression de MPV17 au niveau protéique.**

**(A) Invalidation de MPV17** : Les BM-MSC d'un donneur ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17), ou laissées non-transduites (NT). Après transduction, ces cellules ont été différenciées (D) ou laissées non différenciées (ND) (comme décrit dans la section Matériel & Méthodes). Les cellules ont été lysées dans la condition expansion (Exp), et après 0, 12 et 22 jours de (non) différenciation. Les protéines ont été extraites et l'abondance de MPV17 ainsi que l'histone 3, comme contrôle de charge, a été révélée par western-blot. \* Représentent des bandes aspécifiques.

**(B) Surexpression de MPV17** : Les BM-MSC d'un donneur ont été transduites par des lentivirus surexprimant MPV17 laissées non transduites (NT). Après transduction, les BM-MSC ont été différenciées (D) ou laissée non-différenciées (ND). Les cellules ont été lysées en expansion (EXP), et après 0, 12 et 22 jours de (non) différenciation. Les protéines ont été extraites et l'abondance de MPV17 ainsi que l'histone 3, comme contrôle de charge, a été révélée par western-blot.



Afin de déterminer l'efficacité de modulation, l'ARN a été extrait et l'abondance relative du transcrit de MPV17 a été mesurée par qRT-PCR (Figure III.4.A). Trois contrôles ont été utilisés. Premièrement, la condition expansion (Exp) qui sont des cellules ensemencées dans des boîtes non-coatées au collagène ; toutes les autres conditions sont normalisées à cette condition de référence. Le deuxième contrôle utilisé est la condition non-transduites qui sert à déterminer un éventuel effet secondaire de transduction en le comparant au troisième contrôle : la condition transduite avec un shRNA sans cible (shNT). Dans les conditions non-transduites et transduites avec shNT, le même profil d'expression de MPV17 que dans les résultats précédents est observé, à savoir une induction entre les jours 0 et 12 et une diminution d'expression entre les jours 12 et 22 de la condition différenciée. Ceci suggère que le processus de transduction lentivirale et de sélection par la puromycine n'affecte pas le profil d'expression de MPV17.

Les deux conditions comparées pour évaluer l'efficacité de l'invalidation de MPV17 sont les cellules transduites avec shNT et les cellules transduites avec shMPV17. Au jour 0 de différenciation, une invalidation moyenne de 73% du transcrit de MPV17 a été observée chez les BM-MSC de trois donneurs différents, une invalidation moyenne de 68% a été observée après 12 jours de différenciation (J12D) et 65% d'invalidation moyenne au terme de la différenciation (J22D).

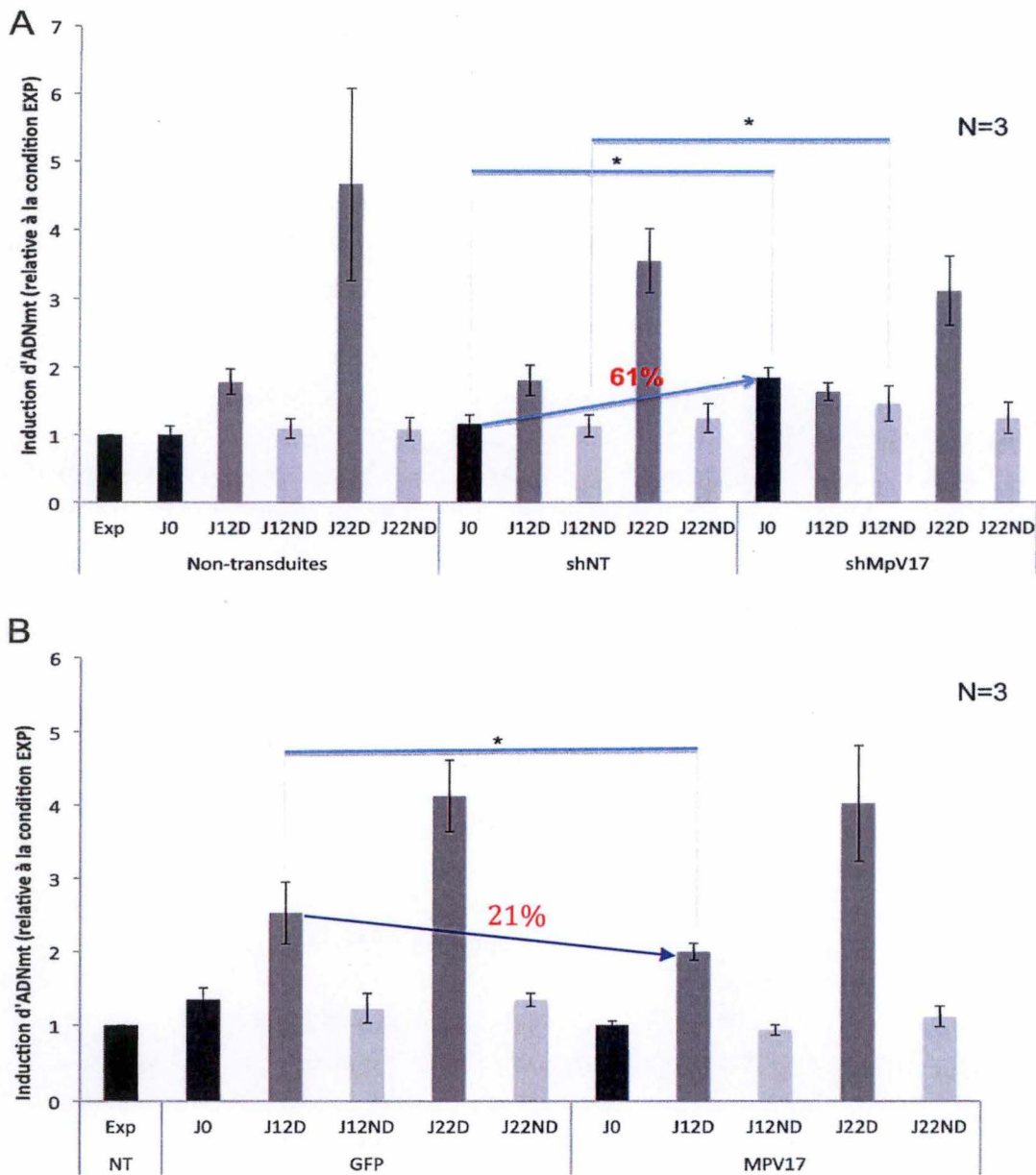
Afin de déterminer l'efficacité de l'invalidation au niveau protéique, MPV17 a été révélé en Western blot chez les BM-MSC transduites d'un donneur (Figure III.5.B). Dans les cellules non-transduites, une bande est observée au poids moléculaire attendu (17kDa) aux jours 12 et 22 dans la condition différenciée (NT J12D et NT J22D), confirmant les résultats obtenus précédemment. De même, une bande est observée aux jours 12 et 22 de la condition différenciée dans les cellules transduites avec des shNT (shNT J12D et shNT J22D), mais aucune bande n'est observée après 12 ou 22 jours de différenciation dans les cellules transduites avec shMPV17. Bien que nous n'ayons pas pu quantifier ces résultats à cause de la mauvaise qualité de l'anticorps MPV17 (le seul disponible sur le marché), nous pouvons considérer que notre stratégie d'invalidation de MPV17 est efficace.

Ces observations au niveau du transcrit et au niveau protéique de MPV17 démontrent une invalidation continue tout au long de la différenciation, permettant l'étude de son impact sur la différenciation hépatogénique (dont la durée est de 22 jours).

### *3.2 : Efficacité de la surexpression de MPV17*

Les cellules de 3 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus surexprimant la GFP (la condition contrôle) et par des lentivirus surexprimant MPV17. Une analyse de l'abondance du transcrit a été réalisée par qRT-PCR.

Au jour 0, le niveau de transcrit moyen de MPV triple dans les BM-MSC transduites (Figure III.4.B). Par contre, le niveau de surexpression atteint durant le protocole de différenciation hépatogénique est moindre : 43% après 12 jours, et 29 % après 22 jours. Cette diminution d'efficacité de surexpression peut s'expliquer par le fait que le transgène était sous le contrôle du promoteur de la phosphoglucokinase, une enzyme de la glycolyse étant sous-exprimée dans les cellules différenciées. Bien que la surexpression du transcrit de MPV17 soit significative, il est important de déterminer son impact au niveau protéique. L'abondance de



**Figure III.6 : Impact de la modulation de MPV17 sur l'abondance de l'ADNmt.**

**(A) Impact de l'inactivation de MPV17 sur l'abondance de l'ADNmt :** Les BM-MSC de 3 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), par des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17), ou laissées non-transduites (NT). Après transduction, ces cellules ont été différenciées (D) ou laissées non différenciées (ND) (comme décrit dans la section Matériel & Méthodes). Les cellules ont été lysées dans la condition expansion (Exp), et après 0, 12 et 22 jours de (non) différenciation. L'ADN a été extrait et l'abondance de l'ADNmt a été mesurée par PCR quantitative, en amplifiant un gène encodé par la mitochondrie (ND2) et un gène nucléaire (Becline). Les résultats sont exprimés en terme de « fold d'induction » comparé à la condition expansion. Les données représentent la moyenne de 3 donneurs +/- l'erreur standard à la moyenne. La significativité a été déterminée par une ANOVA 2 paillée supplémentée par un test de Student-Newman-Keuls. \* Représente la significativité entre les deux conditions de transduction.

**(B) Impact de la surexpression de MPV17 sur l'abondance d'ADNmt :** Les BM-MSC de 3 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus surexprimant MPV17 ou la GFP comme contrôle. Après transduction, les traitements et analyses effectués ont été les mêmes que décrits en (A).



MPV17 a été révélée par Western Blot au jour 0 de différenciation dans les BM-MSC provenant d'un donneur et transduites avec des lentivirus surexprimant MPV17 (Figure III.5.B). Une bande plus intense est observée dans cette condition (MPV17 D0, piste 7) par rapport aux conditions non-transduites différenciées. Ceci suggère que MPV17 est bien surexprimée au niveau protéique, mais nous ne pouvons le quantifier exactement puisque les contrôles correspondants (cellules transduites avec la GFP) n'ont pas été analysées par Western Blot. Ces résultats suggèrent cependant que la stratégie de surexpression de MPV17 permet d'étudier son impact sur la différenciation hépatogénique et l'abondance d'ADNmt.

#### **4. Impact de la modulation de MPV17 sur l'abondance d'ADNmt au cours de la différenciation hépatogénique**

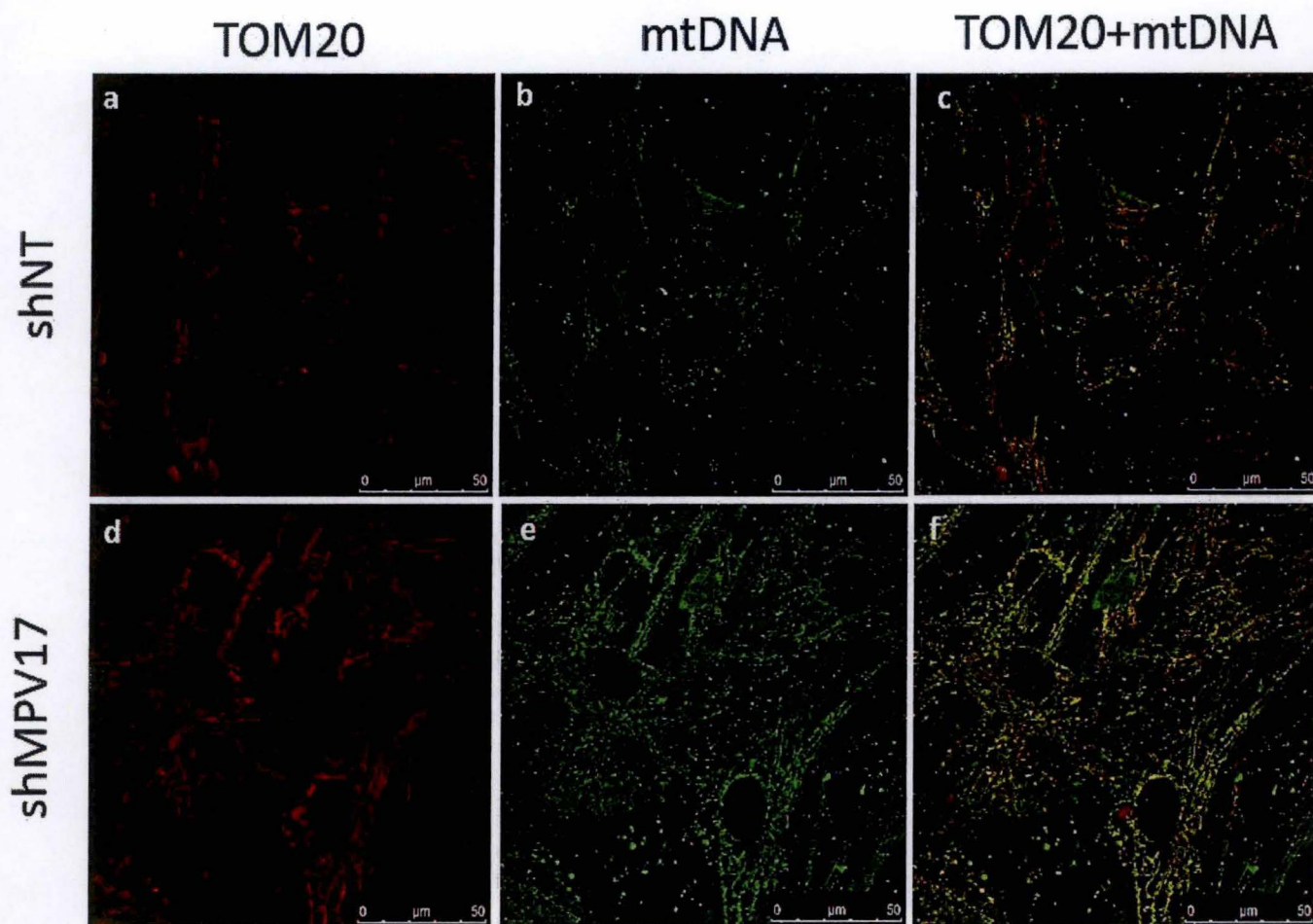
Nous avons vu précédemment que des mutations, ou des délétions de MPV17, étaient associées à la diminution d'ADNmt dans certains types cellulaires tels que les myocytes, podocytes, hépatocytes et neurones (Introduction point 4.2). La différenciation hépatogénique étant caractérisée par une augmentation d'ADNmt, nous avons investigué quel était l'impact de la modulation de l'expression de MPV17 sur celle-ci.

##### *4.1 : Impact de l'invalidation de MPV17 sur l'abondance de l'ADNmt durant la différenciation hépatogénique*

Les cellules étant transduites soit par des lentivirus encodant des shRNA sans cibles/ciblant MPV17, ou laissées non transduites, ont été lysées et l'abondance de l'ADNmt a été mesurée par q-PCR. Le nombre de copies d'ADNmt par cellule est évalué en amplifiant un gène encodé par la mitochondrie d'une part (le gène ND2 (NADH dehydrogenase subunit 2)) et un gène encodé par le noyau d'autre part (le gène Beclin) (Figure III.6.A).

La Figure III.6.A met en évidence qu'une diminution de l'expression de MPV17 (diminution évaluée à 73% au niveau du transcrit : voir Figure III.4.A) provoque une augmentation d'abondance d'ADNmt de 61% au jour 0 de différenciation. Un nombre de copies plus important d'ADNmt (29% d'augmentation) est également observé dans les cellules non différenciées au jour 12. Cependant, aucune autre condition expérimentale ne montre de différence significative entre les cellules transduites avec le shRNA MPV17 et le shRNA sans cible. En effet, au jour 12, les cellules différenciées transduites avec le shRNA MPV17 ont un niveau d'abondance d'ADNmt comparable à celui des cellules transduites avec le shNT. Compte tenu du fait que les cellules invalidées pour MPV17 présentaient une augmentation de l'abondance de l'ADNmt avant de commencer le processus de différenciation, cela revient à dire que les 12 premiers jours de différenciation n'ont pas permis d'augmenter le nombre de copies d'ADNmt par cellules.

L'augmentation d'ADNmt observée lors de l'invalidation de MPV17 est en contradiction avec les connaissances actuelles sur la relation entre MPV17 et l'abondance d'ADNmt. Toutefois rien n'a jamais été documenté sur une relation entre l'activité et l'abondance de MPV17 et l'abondance de l'ADNmt dans les cellules souches, ou les cellules en prolifération.



**Figure III.7 : Impact de l'invalidation de MPV17 sur l'abondance d'ADNmt**

Les BM-MSC d'un donneur ont été transduites par lentivirus exprimant un shRNA sans cibles (shNT) ou un ciblant MPV17 (shMPV17). Après sélection grâce à la puromycine les cellules en expansion ont été fixées et immuno-marquées: TOM20 (rouge) : (a ; c) ; mtDNA (vert) : (b ; e) ; TOM20+mtDNA (c ; f). Les images n'ont pas été prises aux mêmes PMT.



#### *4.2 : Impact de la surexpression de MPV17 sur l'abondance d'ADNmt durant la différenciation hépatogénique*

Les cellules transduites par des lentivirus surexprimant MPV17 ou la GFP ont été lysées et, comme pour l'invalidation, l'abondance d'ADNmt a été évaluée par q-PCR (Figure III.6.B). La surexpression de MPV17 conduit à une légère diminution de l'abondance de l'ADNmt au jour 0 (26%, non significatif), et au jour 12 dans les cellules différenciées (diminution de 21%) quand on la compare avec le contrôle GFP. Cette diminution de l'abondance d'ADNmt ne s'observe plus au jour 22.

Ces observations de diminution de l'abondance d'ADNmt au jour 0 et au jour 12, lorsque MPV17 est surexprimé, sont en accord avec l'augmentation d'ADNmt observée au jour 0 quand MPV17 est invalidé. Ces résultats suggèrent que MPV17 pourrait exercer un rôle spécifique dans l'abondance et le maintien de l'ADNmt quand les cellules sont en prolifération. Ceci pourrait expliquer qu'au terme de la différenciation, cet effet n'est plus présent.

Etant donné que l'invalidation de MPV17 exerce un impact significatif sur l'abondance de l'ADNmt dans les cellules en expansion, nous avons voulu confirmer ceci en visualisant simultanément MPV17 et les nucléoïdes contenant l'ADNmt.

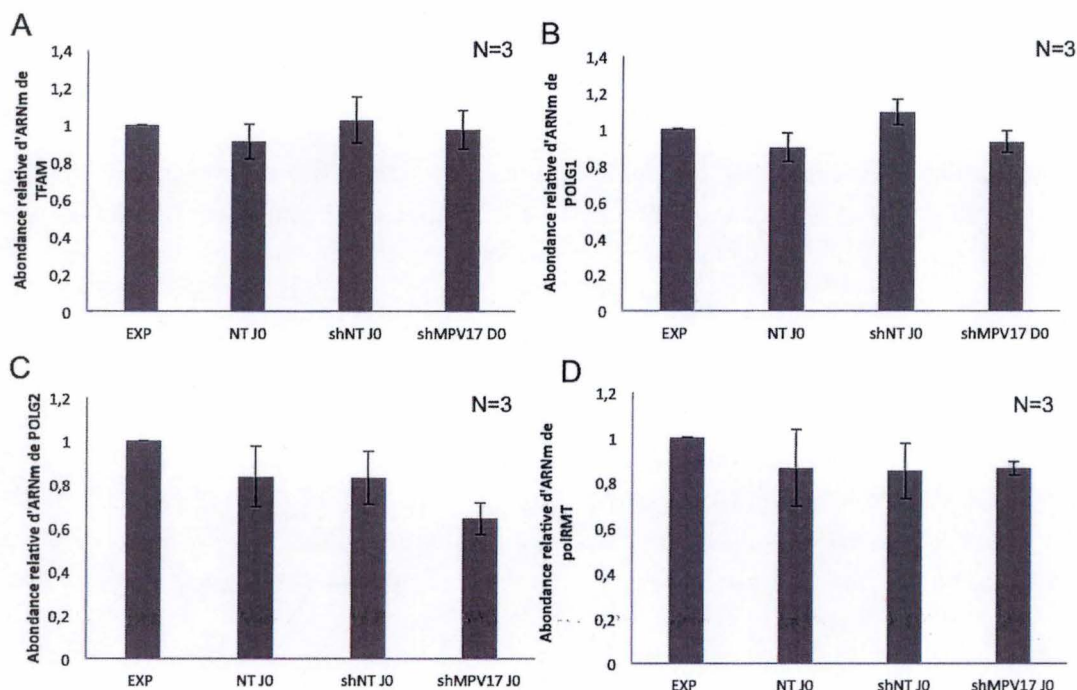
#### *4.3. Visualisation par immuno-fluorescence de l'impact de l'invalidation de MPV17 sur l'ADNmt*

Afin de valider la hausse d'ADNmt quand MPV17 est invalidé, une analyse par immunofluorescence a été réalisée. Cette analyse par immuno-fluorescence est à l'état d'optimisation. Les résultats préliminaires sont présentés à la Figure III.7.

Un immunomarquage de TOM20 (une protéine impliquée dans l'importation des protéines dans la mitochondrie) et de l'ADNmt a été réalisé dans des cellules en expansion transduites avec le shRNA sans cible ou ciblant MPV17. Dans les deux conditions de transduction, une co-localisation de TOM20 et de l'ADNmt est observée. Le marquage de l'ADNmt apparaît ponctué, mettant en évidence les nucléoïdes mitochondriaux. De plus, le réseau mitochondrial présente une localisation périnucléaire typique des cellules souches non différenciées.

Les cellules transduites avec shMPV17 semblent montrer une abondance d'ADNmt plus abondante, ce qui supporte l'augmentation d'ADNmt mesurée par qPCR (Figure III.6).

Cependant, les micrographies n'ont pas été prises avec les mêmes niveaux de photomultiplicateur, ce qui empêche la comparaison des intensités de fluorescence entre les deux conditions transduites. Clairement, cette expérience devrait être reproduite dans les conditions qui permettent de quantifier et comparer les intensités de fluorescence.



**Figure III.8 : Impact de l'inactivation de MPV17 sur l'abondance de transcrits d'acteurs impliqués dans la réplication de l'ADNmt.**

Les BM-MSC de 3 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17), ou laissées non-transduites (NT). Les cellules ont été lysées dans la condition expansion, et au jour 0. L'ARN a été extrait, et l'abondance d'ARNm de **TFAM** (A); **POLG1** (B); **POLG2** (C); **polRMT** (D) a été mesurée par qRT-PCR. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage **PPIE** (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E) et sont exprimés en terme de fold d'induction comparé à la condition expansion. Les données représentent la moyenne de 3 donneurs +/- l'erreur standard à la moyenne. La significativité a été déterminée par une ANOVA



Une deuxième optimisation (résultats non-montrés) d'immuno-fluorescence n'a pas pu arriver à son terme faute de temps. Il s'agit du double marquage de MPV17 et de l'ADNmt dans des cellules surexprimant MPV17. Ces analyses nous auraient permis d'une part de valider la surexpression de MPV17 au niveau protéique (en plus du western blot réalisé), mais surtout de rechercher une éventuelle co-localisation de MPV17 avec l'ADNmt, ce qui aurait pu nous donner des indices quant à sa fonction.

Bien que l'augmentation d'ADNmt n'ait pu être clairement observée en microscopie à fluorescence, cette augmentation n'en est pas moins mise en évidence par qPCR. Pour comprendre par quels mécanismes l'abondance d'ADNmt est modifiée en réponse à la modulation de MPV17 (principalement quand les cellules prolifèrent), l'abondance des transcrits de certains acteurs de la réplication de l'ADNmt a été mesurée.

### **5. Mesure de l'abondance relative de transcrits d'acteurs de la réplication de l'ADNmt**

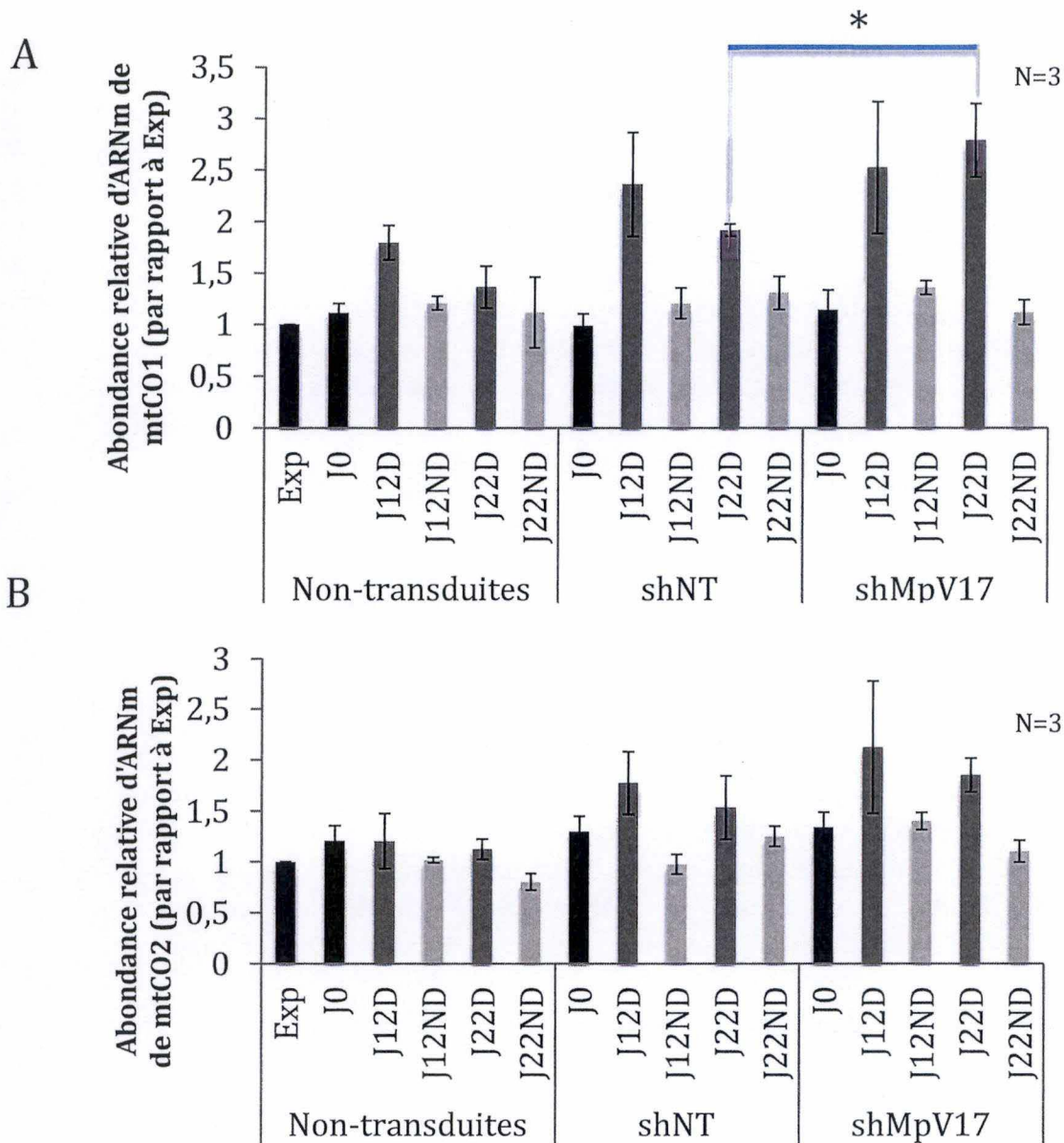
L'abondance de transcrits de différents acteurs impliqués dans la réplication a été mesurée dans des cellules BM-MSC non transduites, transduites avec shNT ou shMPV17 au jour 0 de la différenciation hépatogénique (jour où l'impact de l'invalidation de MPV17 sur l'ADNmt est le plus marqué).

Premièrement, l'abondance de transcrit du facteur de transcription mitochondrial A (TFAM) a été mesurée par qRT-PCR (Figure III.8.A). En effet, il s'avère que ce facteur de transcription mitochondrial est impliqué directement dans la régulation du nombre de copies d'ADNmt. En effet, l'équipe d'Ekstrand a démontré qu'un embryon de souris surexprimant le gène de TFAM humain (qui n'a aucun effet sur la transcription de l'ADNmt murin) conduit à une augmentation d'ADNmt, tandis qu'un embryon de souris TFAM<sup>-/-</sup> présente une déplétion d'ADNmt (Ekstrand et al., 2004).

Aucune différence significative d'abondance relative de transcrit de TFAM entre la condition shNT et la condition shMPV17 n'a pu être mise en évidence. Ceci suggère que TFAM n'est pas impliqué dans l'augmentation de l'ADNmt due à l'invalidation de MPV17.

Le deuxième acteur de la réplication de l'ADNmt analysé est l'ADN polymérase  $\gamma$ . L'ADN polymérase  $\gamma$  se compose de deux sous-unités : POLG1 (catalytique) et POLG2 (accessoire). POLG1 a été démontrée comme étant impliquée dans l'abondance d'ADNmt et plusieurs mutations dans ce gène, s'avèrent être pathologiques (pour une revue, voir (Hudson and Chinnery, 2006)). Quand POLG1 humain muté est surexprimé dans des myocytes de souris, ceux-ci présentent des déplétions, mutations et délétions de l'ADNmt (Lewis et al., 2007). L'équipe de Di Re a également montré qu'une invalidation de POLG2 dans des cellules d'ostéosarcome humain (HOS) provoque une déplétion de l'ADNmt (Di Re et al., 2009).

Aucune différence significative d'abondance relative de transcrit de PolG1 (Figure III.8.B) et PolG2 (C) n'a été observée entre la condition de transduction shNT et shMPV17,



**Figures III.9: Impact de l'invalidation de MPV17 sur la quantité de transcrit de mtCO1 et mtCO2.** Les BM-MSC de 3 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17), ou laissées non-transduites. Après transduction, ces cellules ont été différenciées (D) ou laissées non différenciées (ND) (comme décrit dans la section Matériel & Méthodes). Les cellules ont été lysées dans la condition expansion (Exp), et après 0, 12 et 22 jours de différenciation. L'ARN a été extrait, et l'abondance de transcrit de **mtCO1 (A)** et **mtCO2 (B)** a été mesurée par qRT-PCR. Les résultats sont exprimés en terme de fold d'induction comparé à la condition expansion, et ont été normalisés avec le gène de ménage PPIE (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E). Les données représentent la moyenne de 3 donneurs +/- l'erreur standard à la moyenne. La significativité a été déterminée par une ANOVA 2 paillée supplémentée par un test de Student-Newman-Keuls. \* Représente la significativité entre les deux conditions de transduction.



suggérant que l'augmentation d'ADNmt observée en réponse à l'invalidation de MPV17 n'est pas due à une augmentation du transcrit de l'ADN polymérase  $\gamma$ .

Le troisième acteur de la réplication de l'ADNmt étudié a été PolRMT, l'ARN polymérase mitochondriale. Celle-ci est impliquée dans la réplication de l'ADNmt en transcrivant les amorces nécessaires à la réplication. Aucune différence significative d'abondance de transcrit de PolRMT n'a pu être mise en évidence (Figure III.8.D).

Ces observations suggèrent que l'expression de ces acteurs de la réplication de l'ADNmt n'est pas spécifiquement induite dans les cellules où l'expression de MPV17 a été invalidée. L'augmentation d'ADNmt dans cette condition de transduction ne peut pas s'expliquer par une augmentation d'expression des acteurs de sa réplication. Cependant, seul le niveau des transcrits a été analysé, et ceci devrait être confirmé au niveau protéique par Western Blot, mais n'a pas été réalisé faute de temps. En effet, on ne peut exclure que l'invalidation de MPV17 affecte une régulation de la traduction de ces 4 ARNm.

En plus de l'investigation des causes de l'augmentation de l'ADNmt, nous avons voulu déterminer si cette augmentation d'ADNmt avait des conséquences fonctionnelles, notamment sur la transcription de gènes encodés par le génome mitochondrial.

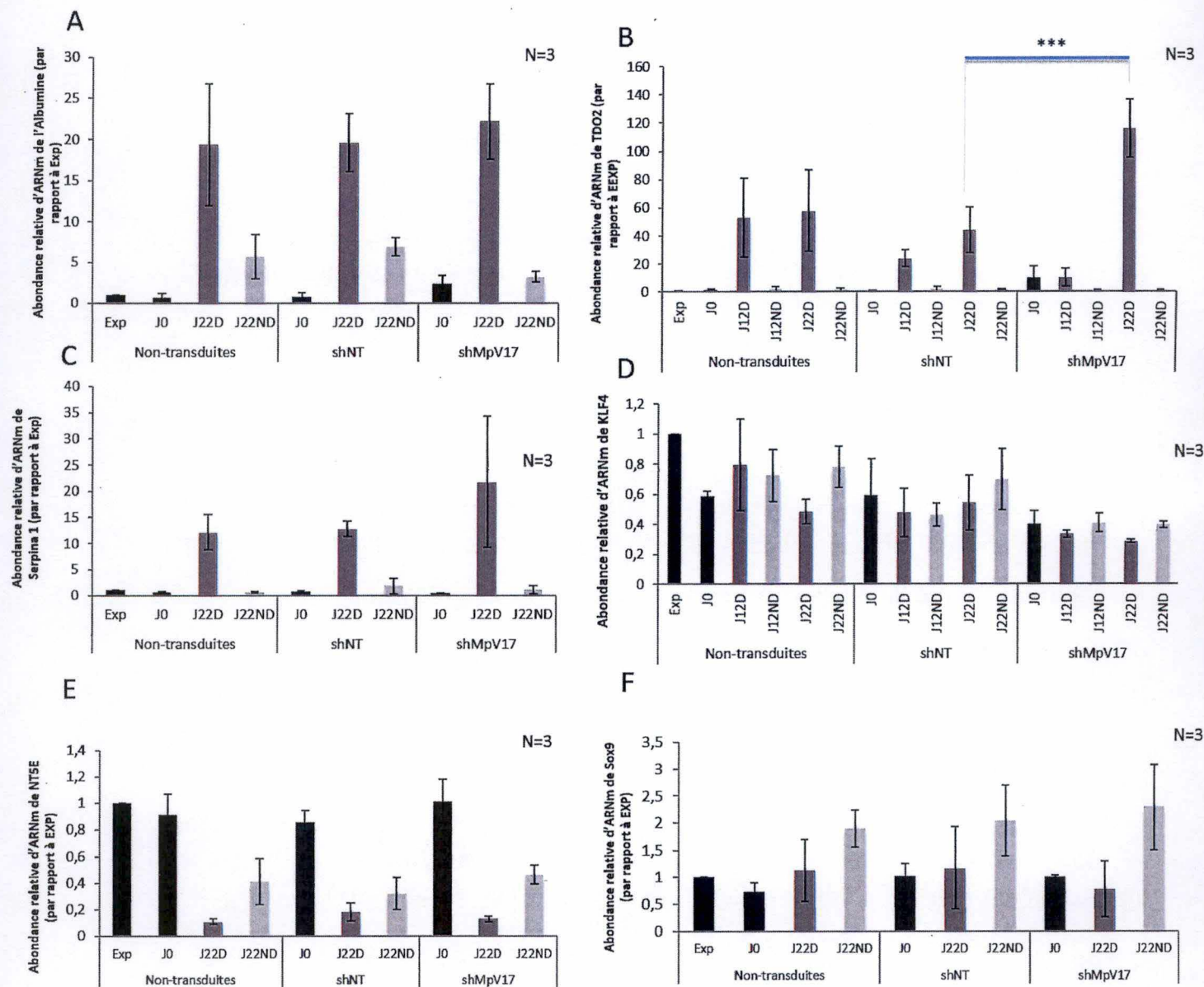
## **6. Effet de l'invalidation de MPV17 sur la transcription de l'ADNmt**

L'invalidation de MPV17 entraînant une augmentation de 63% de l'abondance de l'ADNmt, l'abondance relative de transcrits de deux gènes encodés par l'ADNmt a été mesurée. En effet, le niveau de transcrits mitochondriaux est généralement directement corrélé à l'abondance d'ADNmt (Dillon et al., 2012, Spinazzola et al., 2006, Bottani et al., 2014).

Premièrement l'abondance relative du transcrit de la sous unité 1 de la cytochrome c oxydase (encodé par mtCO1) a été mesuré par qRT-PCR (Figure III.9.A) dans des cellules où l'expression de MPV17 a été invalidée, et dans les deux autres conditions contrôles (comme expliqué dans les points précédents). Bien qu'une tendance à la hausse dans les cellules invalidées pour MPV17 soit observée dans certaines conditions expérimentales (jour 0 et jour 12 de différenciation), celle-ci n'est significative que pour les cellules ayant subi le protocole de différenciation pendant 22 jours.

Le deuxième gène encodé par le génome mitochondrial dont l'expression a été mesurée par qRT-PCR est mtCO2, la sous-unité 2 de la cytochrome C oxydase. Aucune différence significative d'expression de mtCO2 n'a pu être mise en évidence entre la condition dans laquelle MPV17 est invalidée et la condition contrôle. Néanmoins, bien que non significative, une tendance à la hausse est tout de même observée aux jours 12 et 22 de la différenciation (Figure III.9.B).

Ces observations suggèrent que l'augmentation d'ADNmt due à l'invalidation de MPV17 n'a que peu ou pas d'effet sur la transcription de gènes encodés par le génome mitochondrial mise à part pour mtCO1 au 22<sup>ème</sup> jour de la différenciation. En effet, s'il n'est pas exclu qu'une



**Figure III.10: Impact de l'inactivation de MPV17 sur la différenciation hépatogénique et l'expression de différents marqueurs hépatiques et mésenchymateux.** Les BM-MSC de 3 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17), ou laissées non transduites. Après transduction, ces cellules ont été différenciées (D) ou laissées non différenciées (ND) (comme décrit dans la section Matériel & Méthodes). Les cellules ont été lysées dans la condition expansion (Exp), et après 0, 12 et 22 jours de différenciation. L'ARN a été extrait, et l'abondance de transcrit de KLF4 (A) et TDO2 (B) a été mesurée par qRT-PCR en expansion au jour 0, 12 et 22. L'abondance de NT5E (C); Sox9 (D); Albumine (E); et de Serpina1 (F) a uniquement été mesurée dans la condition expansion (EXP), au jour 0 et au jour 22. Les résultats sont exprimés en terme de fold d'induction comparé à la condition expansion, et ont été normalisés avec le gène de ménage PP1E (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E). Les données représentent la moyenne de 3 donneurs  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne. La significativité a été déterminée par une ANOVA 2 paillée supplémentée par un test de Student-Newman-Keuls.

\* Représente la significativité entre les deux conditions de transduction.



augmentation du nombre d'échantillons analysés pourrait permettre de franchir le seuil de significativité, notamment pour le jour 0, l'amplitude de l'induction de mtCO1 et mtCO2 serait de toute façon peu marquée. Il serait néanmoins intéressant d'examiner l'effet de cette augmentation d'ADNmt sur l'abondance protéique des sous-unités codées par l'ADNmt et sur le niveau fonctionnel, par une analyse de la respiration cellulaire.

Notre hypothèse de travail étant que des variations de l'abondance de MPV17 allaient impacter l'abondance de l'ADNmt, et donc la biogenèse mitochondriale, et que celle-ci est nécessaire à la différenciation hépatogénique, nous avons également analysé l'impact de la modulation de MPV17 sur quelques marqueurs de la différenciation hépatogénique.

## 7. Effet de l'invalidation de MPV17 sur les marqueurs de différenciation hépatogénique

La différenciation hépatogénique de BM-MSC se caractérise par une augmentation de l'expression de différents marqueurs de différenciation hépatogénique, mais aussi une diminution d'expression de marqueurs de cellules souches mésenchymateuses. L'abondance relative de 3 marqueurs de différenciation (TDO2, albumine et *serpin1*) et de 3 marqueurs mésenchymateux (KLF4, NT5E et Sox9) a donc été mesurée, afin de déterminer si l'invalidation de MPV17 influençait la différenciation.

Le premier des marqueurs hépatogéniques à avoir été testé est la **Tryptophane 2,3 dioxygénase (TDO2)** une enzyme du métabolisme de dégradation du tryptophane qui permet la catalyse de la réaction de dioxygénation du tryptophane en N-formyl-L-kynurenine. Cette voie est spécifique aux hépatocytes, mais peut dans certaines conditions être catalysée dans d'autres types cellulaires par une enzyme de la même famille : l'indoleamine 2,3-dioxygénase (Thackray et al., 2008). Cette spécificité de TDO2 aux hépatocytes en fait un bon marqueur hépatogénique.

Comme attendu, et montré précédemment (Wanet et al., 2014), les cellules non-transduites différenciées (au jour 22) présentent une expression de TDO2 de l'ordre de 45 fois plus élevée que celle des cellules en expansion (Figure III.10.B). TDO2 est également induit en réponse au cocktail de différenciation dans les cellules contrôles transduites avec un shNT, mais avec une amplitude moindre comparée à celle des cellules non-transduites, suggérant un léger effet secondaire de la transduction sur l'expression de TDO2.

Dans les cellules où MPV17 est invalidé, l'expression de TDO2 au jour 12 des cellules différenciées est plus faible par rapport aux cellules contrôles shNT, mais de manière non significative. Par contre, une augmentation significative d'expression de TDO2 (de l'ordre de 3 x) est observée au jour 22 des cellules différenciées. Ces observations suggèrent que l'invalidation de MPV17 augmente l'expression de la tryptophane 2,3-dioxygénase au terme du processus de différenciation. Cette augmentation est inattendue car ni l'abondance de l'ADNmt (Figure III.6) ni celle des transcrits mitochondriaux analysés (Figure III.7) ne montrent de différence significative entre les cellules transduites avec le shRNA NT et le shRNA MPV17 au 22<sup>ème</sup> jour de la différenciation. L'induction de TDO2 dans les cellules invalidées pour MPV17 pourrait donc s'exercer indépendamment de l'ADNmt. Une



augmentation naturelle de l'expression de TDO2 ayant été documentée dans le cadre du vieillissement (van der Goot et al., 2012), un marquage des cellules au SA- $\beta$ galactosidase pourrait être intéressant. De plus, il serait intéressant de confirmer ces résultats au niveau protéique afin de s'assurer de la réalité biologique de cette observation.

Le 2<sup>ème</sup> marqueur hépatogénique dont l'abondance de transcrit a été mesurée, est l'**Albumine**, cette protéine étant spécifiquement synthétisée par les hépatocytes. Une augmentation de son expression est observée dans les trois conditions de transduction dans les cellules différenciées, mais aucune différence significative n'a été observée entre la condition contrôle et la condition où MPV17 est invalidée (Figure III.10.A). Ces observations suggèrent que l'invalidation de MPV17 n'a pas d'effet sur l'abondance de transcrit d'Albumine.

Le 3<sup>ème</sup> marqueur hépatogénique à avoir été testé est Serpina 1 (**Serpin peptidase inhibitor également appelé alpha-1-antitrypsine**), une protéine inhibant certaines enzymes comme l'élastase, la trypsine, ... Cette enzyme étant sécrétée par les hépatocytes, elle est un bon marqueur de différenciation hépatogénique (Figure III.10.C). L'abondance relative du transcrit de Serpina1 augmente pendant la différenciation hépatogénique dans les cellules différenciées, tant dans les cellules non transduites que dans les cellules transduites contrôle shRNA NT et shRNA MPV17. L'invalidation de MPV17 n'affecte pas l'expression de Serpina 1 induite lors de la différenciation hépatogénique.

Parallèlement à ces marqueurs hépatogéniques, l'abondance de transcrit de marqueurs de cellules souches mésenchymateuses a été mesurée. Premièrement, le facteur de transcription **KLF4 (Kruppel-Factor-4)** a été étudié, un facteur de transcription clé jouant un rôle dans le maintien du caractère « souche ». En effet, il a été montré dans les cellules souches embryonnaires que ce facteur de transcription active l'expression de Nanog, un régulateur clé du maintien de l'auto-renouvellement et de la pluripotence (Zhang et al., 2010). Nanog est impliqué dans l'expression de DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1), réprimant l'expression de certains gènes impliqués dans le cycle cellulaire tels que p16 (inhibiteur de CDK6 et CDK4) et p21 (inhibiteur de CDK1) (Tsai et al., 2012). Ainsi, KLF4 serait donc impliqué dans le maintien du caractère souche, et dans la capacité d'auto-renouvellement.

Au cours de la différenciation hépatogénique, une légère baisse d'expression de KLF4 est observée au cours de la différenciation hépatogénique dans les cellules non-transduites (Figure III.10.D). Cette baisse d'expression n'a pas pu être observée dans les cellules contrôles transduites par un shRNA sans cible (shNT), et aucune différence significative n'a pu être observée entre les cellules transduites par shNT et les cellules transduites avec shMPV17, bien qu'une tendance à la baisse (non significative) soit observée dans toutes les conditions.

Ces résultats peuvent être interprétés de différentes manières. Premièrement, ces mesures d'abondance relatives de transcrit de KLF4 proviennent de cellules primaires de 3 donneurs différents, engendrant une certaine variabilité qui pourrait être réduite en augmentant le nombre d'échantillons analysés. Deuxièmement, les fonctions connues de KLF4 ne se limitent pas au maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement. En effet,



ce facteur de transcription est également un régulateur du caractère pro-inflammatoire des macrophages, (Feinberg et al., 2005), de l'apoptose (McConnell et al., 2007) et de l'oncogenèse en régulant P53 (Rowland et al., 2005). Cette liste non exhaustive des processus biologiques dans lesquels est impliqué KLF4 montre que ce facteur de transcription n'est probablement pas le meilleur marqueur à utiliser pour caractériser la différenciation hépatogénique des cellules souches mésenchymateuses.

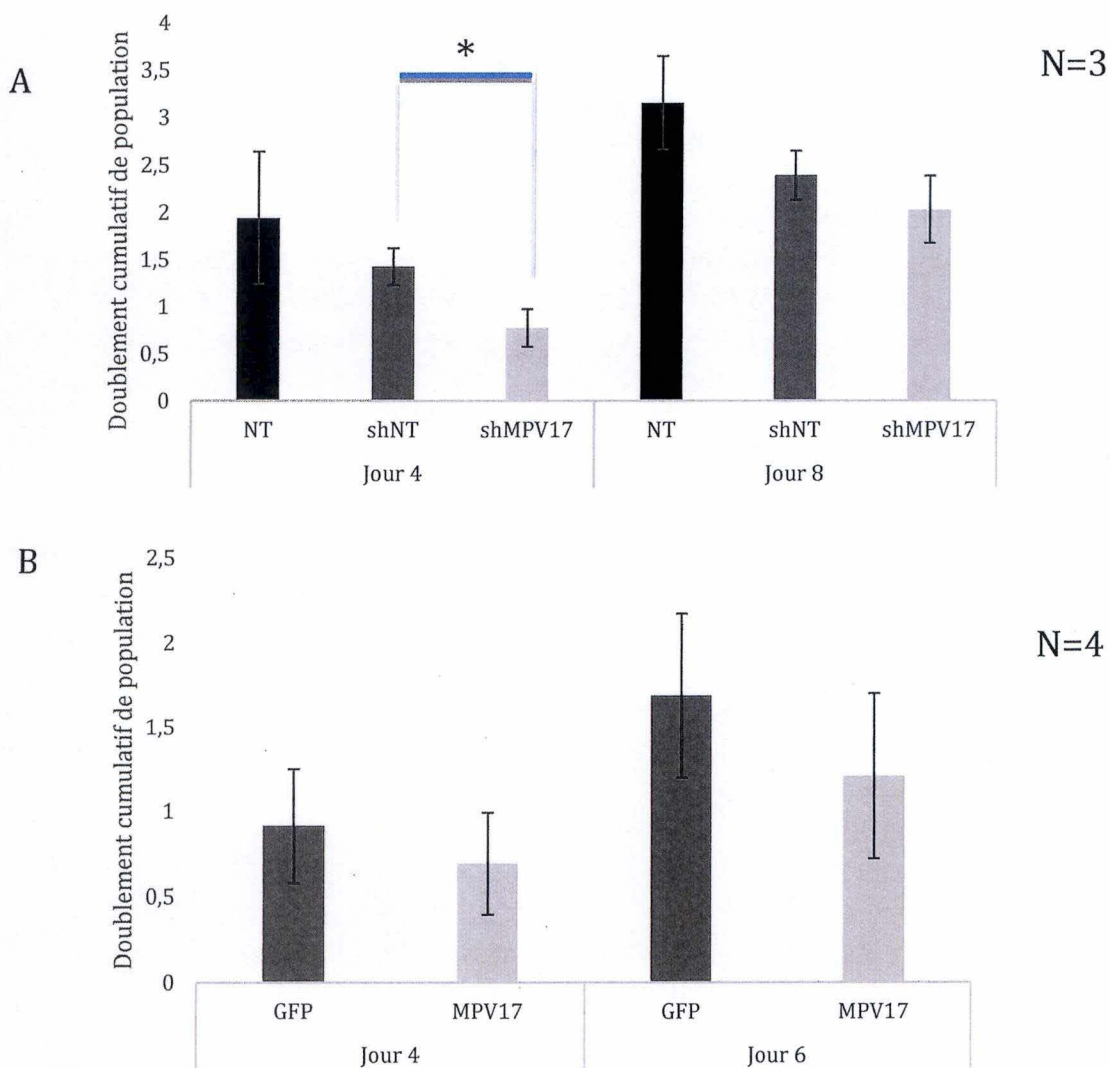
Le deuxième marqueur mésenchymateux à avoir été testé est le **Cluster de différenciation 73** (CD73 aussi appelé NT5E : ecto 5' nucleotidase) (Barry et al., 2001). Comme attendu, au 22<sup>ème</sup> jour de la différenciation hépatogénique, l'expression de CD73 diminue très fortement dans les cellules différenciées. Nous observons également une diminution d'expression dans les cellules non-différenciées, qui pourrait être expliquée par une perte progressive du caractère « souche » au cours des 22 jours de culture à confluence dans du milieu contenant 1% de sérum. Un profil d'expression comparable est également observé dans les cellules transduites, tant par le shRNA NT que par le shRNA MPV17. Aucune différence significative d'expression de CD73 n'a donc pu être observée en réponse à l'invalidation de MPV17 (Figure III.10.E).

**Sox9 (SRY (sex determining region Y)-box 9)** est le dernier marqueur de cellules souches mésenchymateuses dont l'abondance de transcrit a été mesurée. Sox9 est un facteur de transcription impliqué dans le développement de plusieurs tissus comme le cartilage, le cœur, les testicules, les canaux biliaires, ... (Lefebvre et al., 2007). Ce facteur de transcription serait impliqué dans la formation des canaux biliaires et dans le maintien du caractère souche (Furuyama et al., 2011, Antoniou et al., 2009).

Alors qu'une diminution de l'expression de SOX9 est habituellement observée quand des BM-MSC sont soumises à ce protocole de différenciation (Wanet et al., 2014), les résultats montrés à la Figure III.10.F montrent une tendance opposée, bien qu'il n'y ait aucune différence significative entre les conditions J0, cellules différenciées et non différenciées au sein de chaque catégorie de cellules (non transduites, transduites avec le shRNA NT ou avec le shRNA MPV17). Ces résultats s'expliquent par une forte variabilité. Ces observations sont réalisées sur des cellules primaires de trois donneurs différents. Cependant, bien qu'ayant été différenciées selon le même protocole de différenciation (voir Méthodes), un des trois donneurs n'a pas présenté le même profil d'expression de Sox9 habituellement observé lors de la différenciation hépatogénique de cellules souches mésenchymateuses, ceci explique ainsi la grande variabilité de cette mesure.

Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une différence significative d'expression de Sox9 au cours de la différenciation quand MPV17 est invalidé.

En résumé, un seul des 6 marqueurs testés, la tryptophane 2 ; 3-dioxygénase (TDO2) montre une variation d'expression due à l'invalidation de MPV17. De plus, cette variation d'expression survient dans une condition où ni l'abondance de l'ADNmt ni celle des transcrits mitochondriaux n'est modifiée, suggérant un effet indépendant de l'ADNmt. On peut donc conclure que globalement, l'analyse de ces différents marqueurs ne nous permet pas de mettre



**Figure III.11 : Impact de la modulation de MPV17 sur la prolifération de BM-MSC**

**(A) Impact de l'inactivation de MPV17 sur la prolifération de BM-MSC :**

Les BM-MSC de 3 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17), ou laissées non transduites (NT). Ces cellules en expansion ont été fixées au paraformaldéhyde après 1, 4 et 8 jours après ensemencement à 4000 cellules/cm<sup>2</sup>. Un marquage à l'Hoescht a été effectué, et un comptage de noyaux via un microscope inversé en fluorescence (BD-pathway) a été effectué. Les résultats sont exprimés en terme de doublement de population cumulatif, calculé par la formule :  $CDP = \log_2 \text{nombre de noyaux J(testé) / nombre de noyaux J1}$ . Les données représentent la moyenne de 3 donneurs +/- l'erreur standard à la moyenne. La significativité a été déterminée par une ANOVA complétée par un test de Student-Newman-Keuls.

\* Représente la significativité entre les deux conditions de transduction

**(B) Impact de la surexpression de MPV17 sur la prolifération de BM-MSC :**

Les BM-MSC de 4 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus surexprimant la GFP (contrôle) ou des lentivirus surexprimant MPV17. Ces cellules en expansion ont été fixées au paraformaldéhyde après 1, 4 et 6 jours après ensemencement à 4000 cellules/cm<sup>2</sup>. Un marquage à l'Hoescht a été effectué, et un comptage de noyau via un BD-pathway a été effectué. Les résultats sont exprimés en terme de doublement de population cumulatif, calculé par la formule :  $CDP = \log_2 J(4 \text{ ou } 8) / J1$ . Les données représentent la moyenne de 4 donneurs +/- l'erreur standard à la moyenne. La significativité a été déterminé par un test de Student.



en évidence une implication de MPV17 dans la différenciation hépatogénique de cellules souches mésenchymateuses.

Jusqu'à présent, nous avons pu voir que l'effet de l'invalidation de MPV17 était plus marqué au terme de la phase d'expansion cellulaire (J0) (Figure III.6). De plus, nous avons observé que la vitesse de prolifération des cellules où MPV17 était invalidé paraissait nettement plus faible. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'invalidation de MPV17 pouvait affecter la prolifération cellulaire. Nous avons effectué un test de prolifération cellulaire dans des cellules en expansion i) invalidées pour MPV17, et ii) surexprimant MPV17.

## **8. Impact de la modulation de MPV17 sur la prolifération cellulaire des BM-MSC**

### *8.1 : Impact de l'invalidation de MPV17 sur la prolifération*

Les cellules de trois donneurs ont été transduites avec des lentivirus surexprimant un shRNA sans cible, un shRNA ciblant MPV17 ou laissées non transduites. Après une sélection avec puromycine, elles ont étéensemencées puis fixées au paraformaldéhyde 4% après 1, 4 et 8 jours de prolifération. Les noyaux ont alors été colorés à l'Hoescht, et un comptage a été réalisé au microscope inversé à fluorescence (Figure III.11.A).

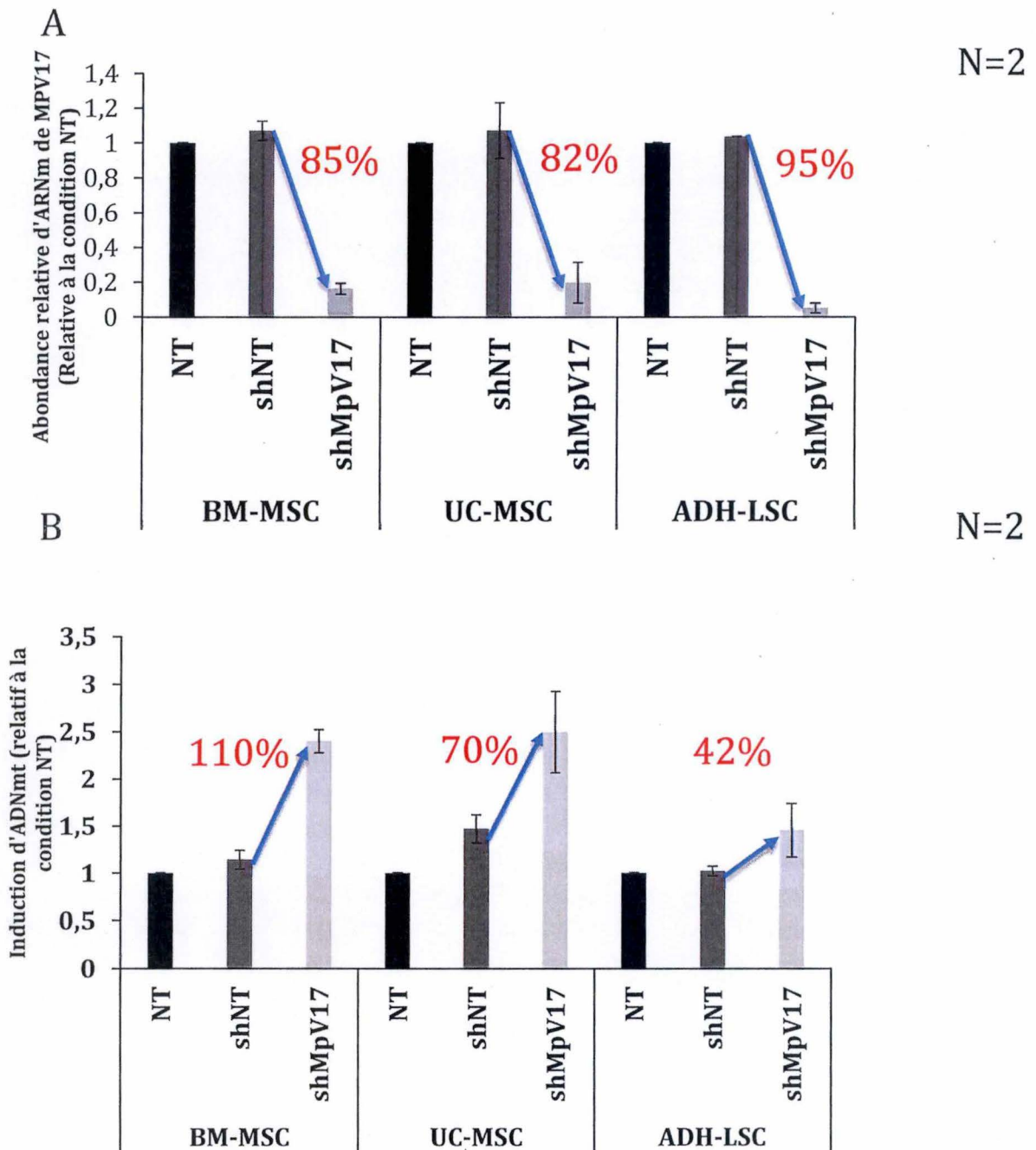
Une légère diminution de prolifération est observée dans les cellules transduites par rapport aux cellules non-transduites. De manière intéressante, une baisse significative de prolifération est observée après 4 jours d'expansion dans les cellules invalidées pour MPV17, par rapport à la condition contrôle shNT. Bien que non significative, cette diminution de prolifération est également observée après 8 jours d'expansion.

Ces observations suggèrent que l'invalidation de MPV17 a un impact sur la prolifération des BM-MSC en expansion. Il était donc particulièrement intéressant d'examiner l'impact d'une surexpression de MPV17 sur la prolifération de ces cellules.

### *8.2 : Impact de la surexpression de MPV17 sur la prolifération*

Après avoir observé cette baisse de prolifération quand MPV17 est invalidé, nous avons investigué l'impact de la surexpression de MPV17 sur la prolifération cellulaire. En utilisant la même stratégie de comptage de noyaux colorés à l'Hoescht, un test de prolifération a été effectué sur des cellules surexprimant la GFP (contrôle) ou MPV17.

La moyenne des données issues de 4 donneurs différents montre une légère diminution (non-significative) de la prolifération dans les cellules surexprimant MPV17 (Figure III.11.B). Il faut cependant souligner la très grande variabilité entre les 4 donneurs. En effet, chez trois d'entre eux, la prolifération des cellules surexprimant MPV17 semblait légèrement plus rapide, tandis que chez le 4<sup>ème</sup> donneur, les cellules semblaient ne plus proliférer (données non-montrées). Cette grande variabilité ne nous permet pas de tirer de conclusion quant à l'impact de la surexpression de MPV17 sur la prolifération cellulaire de BM-MSC. Une



**Figure III.12: Efficacité de l'inactivation de MPV17 et son impact sur l'abondance d'ADNmt de cellules souches ou cellules progénitrices en expansion.**

- (A) **Efficacité de l'inactivation de MPV17 au niveau du transcrit :** Les BM-MSC, UC-MSC, ADH-LSC de 2 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17), ou laissées non transduites (NT). Les cellules ont été lysées en expansion, l'ARN a été extrait et l'abondance d'ARNm de MPV17 a été mesurée par qRT-PCR. Les données sont exprimées en terme de fold d'induction par rapport à la condition non-transduite (NT) et représente la moyenne de 2 donneurs ainsi que l'écart type.
- (B) **Impact de l'inactivation de MPV17 sur l'abondance d'ADNmt.** L'ADN a été extrait et l'abondance d'ADNmt a été mesurée par PCR quantitative, ce en amplifiant un gène encodé par la mitochondrie (ND2) et un gène nucléaire (Becline). Les résultats sont exprimés en terme de fold d'induction comparé à la condition expansion. Les données représentent la moyenne de 2 donneurs ainsi que l'écart type.



augmentation du nombre d'échantillons analysés permettrait de déterminer si une surexpression de MPV17 influence ou non la prolifération cellulaire.

Bien que l'étude de l'impact de la surexpression de MPV17 sur la prolifération soit à ce stade non concluante, celui de l'invalidation de MPV17 dans des cellules en expansion n'en est pas moins observé, du moins au niveau de l'ADNmt (Figure III.6) et au niveau de la prolifération cellulaire (Figure III.11). C'est pourquoi nous avons décidé d'investiguer si l'impact de l'invalidation de MPV17 sur l'ADNmt et la prolifération cellulaire pouvait s'observer également dans d'autres types cellulaires en prolifération.

## **9. Etude de l'impact de l'invalidation de MPV17 dans d'autres types cellulaires en prolifération**

### *9.1 : Impact de l'invalidation de MPV17 sur l'abondance de l'ADNmt de trois types cellulaires en prolifération*

Deux autres types cellulaires prolifératifs humains ont été choisis afin d'étudier l'impact de l'invalidation de MPV17 : les cellules souches mésenchymateuses de sang de cordon (**UC-MSc**) et les cellules progénitrices hépatiques adultes humaines (Adult derived human liver stem cells : **ADH-LSC** (Najimi et al., 2007)).

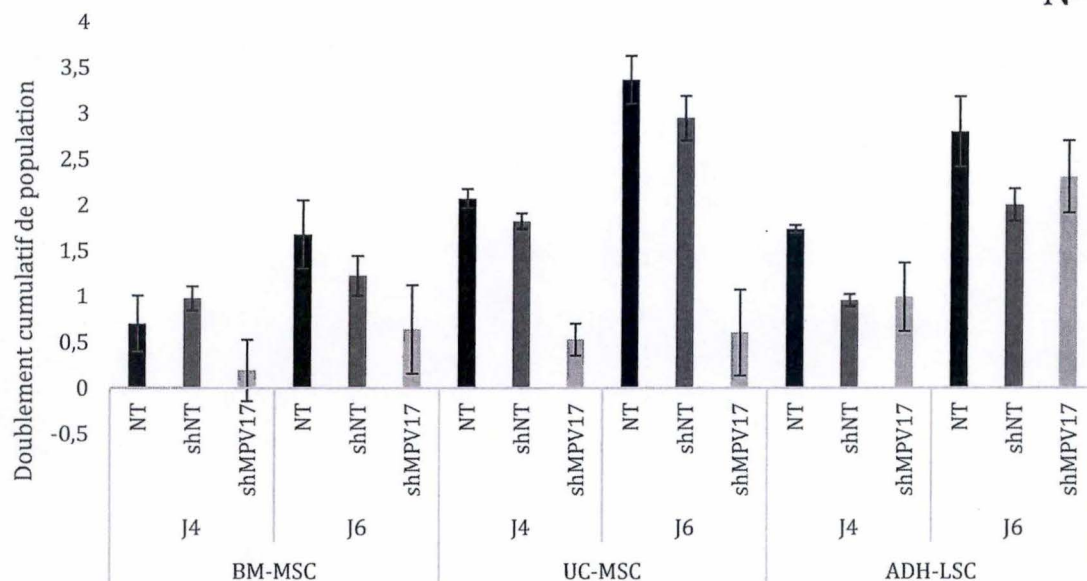
Des BM-MSc ; UC-MSc ; ADH-LSC respectivement de deux donneurs différents ont donc été transduites dans les mêmes conditions que dans les expériences précédentes d'invalidation : un contrôle consistant en des cellules non-transduites (NT), des cellules contrôle transduites avec des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), et des cellules transduites avec le shRNA ciblant MPV17.

Afin de déterminer l'efficacité d'invalidation de MPV17, l'abondance de son transcrit a été mesurée par qRT-PCR (Figure III.12.A). Les résultats obtenus démontrent une efficacité d'invalidation de 85% dans les BM-MSc ; 82% dans les UC-MSc et 95% dans les ADH-LSC, au niveau du transcrit. Il serait intéressant de confirmer ces résultats au niveau protéique, ce qui n'a pu être fait faute de temps.

L'invalidation de MPV17 étant efficace, du moins au niveau du transcrit, nous avons évalué son impact sur le nombre de copies d'ADNmt et l'avons comparé à celui observé dans les BM-MSc en expansion. Le nombre de copies d'ADNmt a été mesuré par q-PCR. Comme observé auparavant, la moyenne du nombre de copies d'ADNmt de deux donneurs de BM-MSc montre une augmentation de 110% du nombre de copies entre les cellules contrôles shNT et les cellules dans lesquelles MPV17 a été invalidé.

Les cellules souches mésenchymateuses de cordons présentent également une augmentation de l'abondance d'ADNmt de 70% dans les cellules où MPV17 est invalidé, et les cellules ADH-LSC présentent une hausse d'abondance d'ADNmt moindre mais tout de même de 42% dans les cellules transduites avec un shMPV17 (Figure III.12.B).

N=2



**Figure III.13 : Impact de l'inactivation de MPV17 sur la prolifération de BM-MSC; UC-MSC et ADH-LSC.**

Les BM-MSC; UC-MSC; ADH-LSC respectivement de 2 donneurs différents ont été transduites par des lentivirus exprimant un shRNA sans cible (shNT), des lentivirus exprimant un shRNA ciblant l'ARNm de MPV17 (shMPV17), ou laissées non transduites (NT). Ces cellules en expansion ont été fixées au paraformaldéhyde après 1, 4 et 6 jours après ensemencement à 4000 cellules/cm<sup>2</sup>. Un marquage à l'Hoescht a été effectué et un comptage de noyau via un BD-pathway a été effectué. Les résultats sont exprimés en terme de doublement de population cumulé par rapport au jour 1, calculé par la formule :  $CDP = \log_2 J(4 \text{ ou } 6)/J1$ . Les données représentent la moyenne de 2 donneurs ainsi que l'écart type.



Ces résultats démontrent, dans 3 types de cellules souches/progénitrices humaines, une implication de MPV17 dans le contrôle du nombre de copies d'ADNmt quand les cellules sont en expansion. Il pourrait être intéressant de voir si cette observation est généralisable à d'autres types de cellules souches telles que les cellules souches embryonnaires ou les cellules souches hématopoïétiques.

Parallèlement à ces analyses de l'impact d'inactivation de MPV17 sur l'ADNmt quand les cellules sont en prolifération, nous avons également décidé de déterminer si une baisse de prolifération est également observée dans ces types cellulaires quand MPV17 est invalidé.

### *9.2 : Impact de l'inactivation de MPV17 sur la prolifération de trois types cellulaires différents*

Nous avons montré précédemment que les BM-MSC, où MPV17 est invalidé, prolifèrent significativement moins rapidement (Figure III.12). C'est pourquoi nous avons décidé d'investiguer si cette baisse de rapidité de prolifération s'observe quand MPV17 est invalidé dans d'autres types cellulaires.

Comme pour le test de prolifération effectué dans l'étude de l'impact de la modulation de MPV17, les BM-MSC ; USC-MSC et ADH-LSC ont été laissées non-transduites, transduites avec des lentivirus exprimant un shRNA sans cible, ou ciblant MPV17. Ces cellules transduites ont alors été ensemencées à une confluence de 4000 cellules/cm<sup>2</sup>, et fixées au paraformaldéhyde après 1, 4 et 6 jours, leurs noyaux colorés à l'Hoeschst et comptés de manière automatisée par un microscope inversé à fluorescence (BD pathway). Comme montré précédemment, les BM-MSC de deux donneurs différents montrent une prolifération moins rapide quand MPV17 est invalidé, après 4 et 6 jours d'expansion. Les UC-MSC présentent aussi ce retard de prolifération quand MPV17 est invalidé, à l'inverse des ADH-LSC (Figure III.13). Il faut noter que pour les ADHLSC, le processus de transduction lentivirale *per se* semble affecter la prolifération cellulaire, puisque celle-ci diminue de 40% (jour 4) et 30% (jour 6) dans les cellules transduites avec le shRNA sans cible (shNT). Cependant, l'absence d'effet de l'inactivation de MPV17 sur la prolifération cellulaire pourrait aussi être liée au fait que les ADHLSC sont un type de cellules souches déjà engagé dans une voie de différenciation, en plus du fait que l'impact de l'inactivation de MPV17 sur l'ADNmt est moins marqué dans les ADHLSC que dans les BM-MSC et les UC-MSC.

Ces données montrent que dans au moins deux types de cellules souches humaines en prolifération (BM-MSC et UC-MSC), on observe une diminution de prolifération due à l'inactivation de MPV17 après 4 et 6 jours.

# Conclusion



#### **IV. Conclusion**

L'objectif de ce mémoire était de caractériser le rôle putatif de MPV17 dans la biogenèse mitochondriale survenant au cours de la différenciation hépatogénique de cellules souches mésenchymateuses.

Comme détaillé dans l'introduction, la protéine MPV17 semble être impliquée dans le maintien de l'ADNmt, puisque son absence ou certaines de ses mutations sont associées à des syndromes de déplétion en ADNmt (Spinazzola et al., 2006, Bottani et al., 2014, Reinhold et al., 2012). La différenciation de cellules souches mésenchymateuses étant accompagnée d'une augmentation d'ADNmt (Wanet et al., 2014) et d'une induction de l'abondance relative de transcrite de MPV17 mise en évidence dans une analyse transcriptomique préliminaire (Figure I.7). L'hypothèse de travail de ce mémoire, était donc que l'augmentation d'ADNmt observée lors de la différenciation hépatogénique pourrait être due, au moins en partie, à l'induction de MPV17.

La première partie de ce mémoire a permis de valider l'induction d'expression de MPV17 au cours de la différenciation hépatogénique, tant au niveau transcrite qu'au niveau protéique, et ce dans des BM-MSC provenant de plusieurs donneurs différents. Ceci nous a confortés dans le fait que MPV17 pourrait participer à la biogenèse mitochondriale - et plus particulièrement à l'augmentation d'ADN mitochondrial - survenant au cours de la différenciation hépatogénique. Une analyse par immuno-fluorescence a également permis de confirmer que MPV17 avait la même localisation subcellulaire mitochondriale qu'observée dans des cellules HeLa et COS7 (Spinazzola et al., 2006).

Dans la deuxième partie du mémoire, une stratégie de modulation de l'expression de MPV17, basée sur l'utilisation de lentivirus, a été mise au point afin d'étudier l'impact de cette protéine sur l'abondance de l'ADNmt et la différenciation hépatogénique de BM-MSC. L'efficacité de l'inactivation de MPV17 et de sa surexpression a tout d'abord été évaluée, sur le niveau de transcrite et de protéine MPV17. Une efficacité moyenne d'inactivation de 73%, et une efficacité moyenne de surexpression de MPV17 de 297% ont été observées au niveau du transcrite, au terme de la phase l'expansion.

L'étude de l'impact de l'inactivation de MPV17 sur l'abondance d'ADN mitochondrial a permis de mettre en évidence une augmentation de 61% de nombre de copies d'ADNmt, tandis que la surexpression de MPV17 en induit une légère diminution au jour 0 (26%, non significatif) et au 12<sup>ème</sup> jour de la différenciation (21%).

Ces observations sont en contradiction avec les résultats obtenus par les équipes de Spinazzola et Bottani qui ont caractérisé une diminution significative d'abondance d'ADNmt dans certains tissus murins comme le cerveau, les muscles, les reins, et le foie, consécutive à la délétion du gène codant pour MPV17 (Spinazzola et al., 2006, Bottani et al., 2014).

L'impact de la délétion ou la mutation de MPV17 sur l'ADNmt dans ces modèles ont un effet opposé à celui observé quand MPV17 est invalidé dans des BM-MSC *in vitro*. Ces résultats suggèrent que MPV17 pourrait avoir un rôle opposé en fonction de l'état prolifératif cellulaire. Ceci pourrait expliquer que cette inactivation de MPV17 a un impact sur



l'abondance d'ADNmt au terme de la phase proliférative (jour 0 de la différenciation), et très peu dans les cellules en différenciations (qui sont non-prolifératives).

Afin de déterminer si cette augmentation d'ADNmt pouvait être due à une augmentation d'expression d'acteurs de sa réplication, l'abondance relative de transcrits de quatre de ces acteurs a été mesurée. En effet, des études ont démontré l'implication de TFAM, PolG1 et PolG2 dans l'abondance d'ADNmt (Ekstrand et al., 2004, Lewis et al., 2007, Di Re et al., 2009). Aucune différence significative n'a pu être observée dans les cellules où MPV17 a été invalidé lors de l'analyse de l'abondance des transcrits de POLG1, POLG2, TFAM et PolRMT. Il aurait été intéressant d'étudier leur abondance au niveau protéique.

Voyant que l'effet de l'invalidation de MPV17 sur l'ADNmt n'est visible qu'au terme de l'expansion, MPV17 a été invalidé dans deux autres types cellulaires en prolifération : les cellules souches mésenchymateuses de cordon ombilical et les cellules progénitrices hépatiques adultes humaines. L'invalidation de MPV17 dans ces deux types cellulaires a le même effet que dans les cellules souches mésenchymateuses dérivées de moëlle osseuse sur l'ADNmt. L'étude de l'impact de la surexpression de MPV17 dans ces deux types cellulaires aurait été intéressante, mais n'a pas pu être réalisée faute de temps.

Une étude intéressante à mener serait d'isoler les cellules souches embryonnaires de blastula de souris MPV17<sup>-/-</sup> afin de déterminer si cette hausse d'abondance d'ADNmt est observable *in vivo* dans des cellules ES prolifératives ou s'il s'agit d'un artéfact de culture *in vitro*.

Une augmentation d'abondance d'ADNmt ayant été mise en évidence dans les cellules où MPV17 est invalidé, nous avons décidé d'investiguer quel en était l'impact sur la transcription de l'ADNmt. En effet, le niveau de transcrit mitochondrial est généralement corrélé à l'abondance d'ADNmt (Dillon et al., 2012). L'abondance relative de transcrits de deux sous-unités de la cytochrome c oxydase a donc été mesurée, et aucune augmentation majeure de transcrit n'a pu être mise en évidence. Une analyse sur un échantillon plus grand aurait peut-être permis de franchir le seuil de significativité. En effet, dans les cellules transduites avec shMPV17, l'abondance de transcrit augmentait chez deux des trois donneurs au terme de la phase d'expansion (J0), ces résultats pourraient donc s'expliquer par une grande variabilité entre les donneurs. Il est également possible que l'expression de ces gènes mitochondriaux (codant des sous-unités de complexe de la chaîne respiratoire) ne soit pas impactés, le métabolisme des cellules souches en prolifération étant préférentiellement glycolitique.

L'un des objectifs de mémoire était l'étude de l'impact de l'invalidation de MPV17 sur la différenciation hépatogénique. Pour ce faire, l'abondance relative de transcrits de différents marqueurs de la différenciation hépatogéniques et de marqueurs de cellules souches mésenchymateuses a été mesurée. Les observations n'ont pas permis de mettre en évidence un impact clair de l'invalidation de MPV17 sur la différenciation hépatogénique.



Le seul marqueur de différenciation ayant été significativement impacté est la tyrosine 2,3-dioxygénase (TDO2), une protéine impliquée dans le métabolisme de la tyrosine. Dans le cadre d'une invalidation de MPV17 hypothétiquement impliqué dans la différenciation hépatogénique, nous aurions pu nous attendre à une diminution d'expression de TDO2, puisque c'est un marqueur hépatogénique. Or, de manière surprenante, l'invalidation de MPV17 augmente l'expression de ce marqueur. Une augmentation de l'expression de ce gène a été documentée lors du vieillissement (van der Goot et al., 2012). Un test de SA- $\beta$ galactosidase pourrait être un bon moyen d'investiguer si les cellules où MPV17 est invalidé entrent en sénescence.

L'hypothèse principale de ce mémoire était que MPV17 était impliqué dans l'augmentation d'ADNmt accompagnant la différenciation hépatogénique. Or, nous n'observons pas de changement d'abondance d'ADNmt au cours de cette différenciation hépatogénique. Il n'est donc pas surprenant que nous n'ayons pas réussi à mettre en évidence un impact de l'invalidation de MPV17 sur la différenciation hépatogénique.

Parallèlement à cette étude de l'impact de l'invalidation de MPV17 sur la différenciation et l'abondance d'ADNmt, nous avons observé une prolifération plus lente des cellules transduites avec shMPV17. Un test de prolifération a donc été réalisé sur des cellules en expansion.

Une diminution de prolifération a été mise en évidence dans les cellules souches mésenchymateuses de moëlle osseuse et dans les cellules souches mésenchymateuses de cordon ombilical. Par contre, cette baisse de prolifération n'a pas pu être mise en évidence dans les cellules progénitrices de foie, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules souches sont déjà engagées dans une lignée de cellules différenciation.

L'invalidation de MPV17 entraîne donc à la fois une augmentation d'ADNmt, et un effet négatif sur la prolifération. A ce stade, nous ne pouvons pas être certains que les deux effets sont interdépendants, mais c'est une possibilité. Or l'équipe de Mandal a mis en évidence une corrélation entre fonction mitochondriale et prolifération de cellules ES. En effet, celles-ci présentaient un retard de prolifération quand elles étaient traitées au CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, un agent découplant), en comparaison aux cellules non-traitées. Ces résultats démontrent donc l'importance d'un faible métabolisme oxydatif dans la prolifération des cellules ES (Mandal et al., 2011).

Il serait donc intéressant d'analyser les capacités de respiration de ces cellules où MPV17 est invalidé, grâce à la technologie SeaHorse qui permet une mesure de la respiration basale, la respiration maximale et la production d'ATP (SeaHorse Bioscience), afin d'investiguer si la baisse de prolifération, peut être causée par une diminution du métabolisme oxydatif.

La construction du plasmide lentiviral permettant la surexpression de MPV17 a pris plus de temps que prévu, et bien que la priorité ait été mise sur les cellules en expansion (seules cellules où un impact de l'invalidation de MPV17 est observé), l'étude de la surexpression de MPV17 est à l'état préliminaire, et il serait également intéressant d'étudier son impact sur la différenciation hépatogénique, ainsi que sur la transcription de l'ADNmt.



Une autre approche permettant de déterminer le rôle biologique de MPV17 serait d'étudier quels sont ses interactants protéiques dans le complexe de 600kDa qui pourrait être un pore (Bottani et al., 2014). Cette étude pourrait être réalisée soit en mettant au point une technique d'électrophorèse en gel blue native, ou une co-immunoprécipitation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Il est à noter que l'équipe de Bottani a tenté d'effectuer une électrophorèse blue native pour analyser la composition de ce complexe. Etant donné la mauvaise qualité du seul anti-corps existant, cette équipe a mis au point cette stratégie en surexprimant MPV17 avec un tag hémagglutinine. Malheureusement, une fois supplémenté de ce tag, MPV17 n'est plus capable de rejoindre son complexe (Bottani et al., 2014). Ce problème pourrait être contourné en surexprimant MPV17 à l'aide de la construction lentivirale que nous avons réalisée.

Bien que peu de choses soit connues sur les fonctions de MPV17 et son complexe, une équipe Allemande, à l'origine de la souris MPV17<sup>-/-</sup> a émis l'hypothèse que MPV17 pourrait être impliqué dans le transport actif de nucléotides ou de leurs précurseurs, ce qui pourrait expliquer le fait que MPV17 soit associée au maintien et à l'abondance de l'ADNmt. Cependant, nos résultats sont en contradiction avec cette hypothèse, puisque quand MPV17 est invalidé dans les cellules souches mésenchymateuses en expansion, l'abondance de l'ADN mitochondrial augmente.

Pour résumer, MPV17 a été validée comme étant induit au niveau protéique et transcrit au cours de la différenciation hépatogénique. L'étude des marqueurs mésenchymateux et hépatogéniques effectuée dans des cellules invalidées pour MPV17 ne montre pas une implication claire de MPV17 dans la différenciation hépatogénique. Quant à l'impact de l'invalidation de MPV17 sur le phénotype mitochondrial (analysé au niveau de l'ADNmt, mtCO1 et mtCO2), il est quasiment inexistant sur les cellules en différenciation, mais il est visible au jour 0 de la différenciation en ce qui concerne l'ADNmt, ce qui suggère que MPV17 influence la régulation de l'abondance de l'ADNmt lorsque les cellules sont en expansion. Nous avons confirmé que l'invalidation de MPV17 dans plusieurs types de cellules souches en expansion entraîne une augmentation de l'ADNmt et une diminution de la prolifération cellulaire.

Les résultats montrés dans ce mémoire suggèrent donc que MPV17 a un rôle prépondérant dans les cellules en prolifération par opposition aux cellules non-prolifératives. Les résultats obtenus lors de notre étude ne peuvent être comparés à aucune autre étude, puisque MPV17 n'a jamais été étudié dans le cadre du maintien de l'ADNmt dans des cellules en prolifération.

Beaucoup de travail reste encore à faire pour comprendre le rôle biologique de MPV17 dans le maintien de l'ADNmt et le contrôle du nombre de ses copies, et comprendre quelles différences fonctionnelles distinguent MPV17 dans des cellules prolifératives, ou non-prolifératives.



# Bibliographie

ANDERSON, S., BANKIER, A. T., BARRELL, B. G., DE BRUIJN, M. H., COULSON, A. R., DROUIN, J., EPERON, I. C., NIERLICH, D. P., ROE, B. A., SANGER, F., SCHREIER, P. H., SMITH, A. J., STADEN, R. & YOUNG, I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-65.

ANTONIOU, A., RAYNAUD, P., CORDI, S., ZONG, Y., TRONCHE, F., STANGER, B. Z., JACQUEMIN, P., PIERREUX, C. E., CLOTMAN, F. & LEMAIGRE, F. P. 2009. Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology*, 136, 2325-33.

BARRY, F., BOYNTON, R., MURPHY, M., HAYNESWORTH, S. & ZAIA, J. 2001. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 519-24.

BLATTNER, S. M., CUNNINGHAM, J. T., VERDEGUER, F., CHIM, H., HAAS, W., LIU, H., ROMANINO, K., RUEGG, M. A., GYGI, S. P., SHI, Y. & PUIGSERVER, P. 2012. Yin Yang 1 deficiency in skeletal muscle protects against rapamycin-induced diabetic-like symptoms through activation of insulin/IGF signaling. *Cell Metab*, 15, 505-17.

BOTTANI, E., GIORDANO, C., CIVILETTO, G., DI MEO, I., AURICCHIO, A., CIUSANI, E., MARCHET, S., LAMPERTI, C., D'AMATI, G., VISCOMI, C. & ZEVIANI, M. 2014. AAV-mediated liver-specific MPV17 expression restores mtDNA levels and prevents diet-induced liver failure. *Mol Ther*, 22, 10-7.

CHEN, C. T., SHIH, Y. R., KUO, T. K., LEE, O. K. & WEI, Y. H. 2008. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26, 960-8.

CHUNG, S., ARRELL, D. K., FAUSTINO, R. S., TERZIC, A. & DZEJA, P. P. 2010. Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 725-34.

CIPOLLESCHI, M. G., DELLO SBARBA, P. & OLIVOTTO, M. 1993. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*, 82, 2031-7.

CUNNINGHAM, J. T., RODGERS, J. T., ARLOW, D. H., VAZQUEZ, F., MOOTHA, V. K. & PUIGSERVER, P. 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 $\alpha$  transcriptional complex. *Nature*, 450, 736-40.

DALLABONA, C., MARSANO, R. M., ARZUFFI, P., GHEZZI, D., MANCINI, P., ZEVIANI, M., FERRERO, I. & DONNINI, C. 2010. Sym1, the yeast ortholog of the MPV17 human disease protein, is a stress-induced bioenergetic and morphogenetic mitochondrial modulator. *Hum Mol Genet*, 19, 1098-107.

DI RE, M., SEMBONGI, H., HE, J., REYES, A., YASUKAWA, T., MARTINSSON, P., BAILEY, L. J., GOFFART, S., BOYD-KIRKUP, J. D., WONG, T. S., FERSHT, A. R., SPELBRINK, J. N. & HOLT, I. J. 2009. The accessory subunit of mitochondrial DNA polymerase gamma determines the DNA content of mitochondrial nucleoids in human cultured cells. *Nucleic Acids Res*, 37, 5701-13.



DILLON, L. M., WILLIAMS, S. L., HIDA, A., PEACOCK, J. D., PROLLA, T. A., LINCOLN, J. & MORAES, C. T. 2012. Increased mitochondrial biogenesis in muscle improves aging phenotypes in the mtDNA mutator mouse. *Hum Mol Genet*, 21, 2288-97.

EKSTRAND, M. I., FALKENBERG, M., RANTANEN, A., PARK, C. B., GASPARI, M., HULTENBY, K., RUSTIN, P., GUSTAFSSON, C. M. & LARSSON, N. G. 2004. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet*, 13, 935-44.

FACUCHO-OLIVEIRA, J. M., ALDERSON, J., SPIKINGS, E. C., EGGINTON, S. & ST JOHN, J. C. 2007. Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 120, 4025-34.

FALKENBERG, M., GASPARI, M., RANTANEN, A., TRIFUNOVIC, A., LARSSON, N. G. & GUSTAFSSON, C. M. 2002. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet*, 31, 289-94.

FEINBERG, M. W., CAO, Z., WARA, A. K., LEBEDEVA, M. A., SENBANERJEE, S. & JAIN, M. K. 2005. Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages. *J Biol Chem*, 280, 38247-58.

FISHER, R. P., TOPPER, J. N. & CLAYTON, D. A. 1987. Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements. *Cell*, 50, 247-58.

FOLMES, C. D., NELSON, T. J., MARTINEZ-FERNANDEZ, A., ARRELL, D. K., LINDOR, J. Z., DZEJA, P. P., IKEDA, Y., PEREZ-TERZIC, C. & TERZIC, A. 2011. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab*, 14, 264-71.

FRIEDENSTEIN, A. J., PETRAKOVA, K. V., KUROLESOVA, A. I. & FROLOVA, G. P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6, 230-47.

FURUYAMA, K., KAWAGUCHI, Y., AKIYAMA, H., HORIGUCHI, M., KODAMA, S., KUHARA, T., HOSOKAWA, S., ELBAHRAWY, A., SOEDA, T., KOIZUMI, M., MASUI, T., KAWAGUCHI, M., TAKAORI, K., DOI, R., NISHI, E., KAKINOKI, R., DENG, J. M., BEHRINGER, R. R., NAKAMURA, T. & UEMOTO, S. 2011. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet*, 43, 34-41.

GLEYZER, N., VERCAUTEREN, K. & SCARPULLA, R. C. 2005. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*, 25, 1354-66.

HANDSCHIN, C., RHEE, J., LIN, J., TARR, P. T. & SPIEGELMAN, B. M. 2003. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7111-6.

HENSEN, F., CANSIZ, S., GERHOLD, J. M. & SPELBRINK, J. N. 2014. To be or not to be a nucleoid protein: a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie*, 100, 219-26.

- HOLT, I. J., LORIMER, H. E. & JACOBS, H. T. 2000. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, 100, 515-24.
- HSU, S. H., CHEN, C. T. & WEI, Y. H. 2013. Inhibitory effects of hypoxia on metabolic switch and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 31, 2779-88.
- HUDSON, G. & CHINNERY, P. F. 2006. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2, R244-52.
- JAKOBSEN, J. S., WAAGE, J., RAPIN, N., BISGAARD, H. C., LARSEN, F. S. & PORSE, B. T. 2013. Temporal mapping of CEBPA and CEBPB binding during liver regeneration reveals dynamic occupancy and specific regulatory codes for homeostatic and cell cycle gene batteries. *Genome Res*, 23, 592-603.
- KARADIMAS, C. L., VU, T. H., HOLVE, S. A., CHRONOPOULOU, P., QUINZII, C., JOHNSEN, S. D., KURTH, J., EGGERS, E., PALENZUELA, L., TANJI, K., BONILLA, E., DE VIVO, D. C., DIMAURO, S. & HIRANO, M. 2006. Navajo neurohepatopathy is caused by a mutation in the MPV17 gene. *Am J Hum Genet*, 79, 544-8.
- KIM, J., LEE, J. H. & IYER, V. R. 2008. Global identification of Myc target genes reveals its direct role in mitochondrial biogenesis and its E-box usage in vivo. *PLoS One*, 3, e1798.
- KOBAYASHI, T., MIZUNO, H., IMAYOSHI, I., FURUSAWA, C., SHIRAHIGE, K. & KAGEYAMA, R. 2009. The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev*, 23, 1870-5.
- KRAUSS, J., ASTRINIDIS, P., FROHNHOFER, H. G., WALDERICH, B. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 2013. transparent, a gene affecting stripe formation in Zebrafish, encodes the mitochondrial protein Mpv17 that is required for iridophore survival. *Biol Open*, 2, 703-10.
- LEE, Y. J., SWENCKI, B., SHOICHET, S. & SHIVDASANI, R. A. 1999. A possible role for the high mobility group box transcription factor Tcf-4 in vertebrate gut epithelial cell differentiation. *J Biol Chem*, 274, 1566-72.
- LEFEBVRE, V., DUMITRIU, B., PENZO-MENDEZ, A., HAN, Y. & PALLAVI, B. 2007. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 2195-214.
- LEWIS, W., DAY, B. J., KOHLER, J. J., HOSSEINI, S. H., CHAN, S. S., GREEN, E. C., HAASE, C. P., KEEBAUGH, E. S., LONG, R., LUDAWAY, T., RUSS, R., STELTZER, J., TIOLECO, N., SANTOIANNI, R. & COPELAND, W. C. 2007. Decreased mtDNA, oxidative stress, cardiomyopathy, and death from transgenic cardiac targeted human mutant polymerase gamma. *Lab Invest*, 87, 326-35.
- LIN, J., WU, H., TARR, P. T., ZHANG, C. Y., WU, Z., BOSS, O., MICHAEL, L. F., PUIGSERVER, P., ISOTANI, E., OLSON, E. N., LOWELL, B. B., BASSEL-DUBY, R. & SPIEGELMAN, B. M. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418, 797-801.



LOLLGEN, S. & WEIHER, H. 2015. The role of the Mpv17 protein mutations of which cause mitochondrial DNA depletion syndrome (MDDS): lessons from homologs in different species. *Biol Chem*, 396, 13-25.

LONERGAN, T., BAVISTER, B. & BRENNER, C. 2007. Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion*, 7, 289-96.

MANDAL, S., LINDGREN, A. G., SRIVASTAVA, A. S., CLARK, A. T. & BANERJEE, U. 2011. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem Cells*, 29, 486-95.

MARTIN, G. R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7634-8.

MCCONNELL, B. B., GHALEB, A. M., NANDAN, M. O. & YANG, V. W. 2007. The diverse functions of Kruppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *Bioessays*, 29, 549-57.

METODIEV, M. D., LESKO, N., PARK, C. B., CAMARA, Y., SHI, Y., WIBOM, R., HULTENBY, K., GUSTAFSSON, C. M. & LARSSON, N. G. 2009. Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab*, 9, 386-97.

MEYER ZUM GOTTESBERGE, A. M., REUTER, A. & WEIHER, H. 1996. Inner ear defect similar to Alport's syndrome in the glomerulosclerosis mouse model Mpv17. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 253, 470-4.

MICHAEL, L. F., WU, Z., CHEATHAM, R. B., PUIGSERVER, P., ADELMANT, G., LEHMAN, J. J., KELLY, D. P. & SPIEGELMAN, B. M. 2001. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3820-5.

NAJIMI, M., KHUU, D. N., LYSY, P. A., JAZOULI, N., ABARCA, J., SEMPOUX, C. & SOKAL, E. M. 2007. Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? *Cell Transplant*, 16, 717-28.

NGO, H. B., KAISER, J. T. & CHAN, D. C. 2011. The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 18, 1290-6.

OJUKA, E. O., JONES, T. E., HAN, D. H., CHEN, M., WAMHOFF, B. R., STUREK, M. & HOLLOSZY, J. O. 2002. Intermittent increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E1040-5.

PALOMAKI, S., PIETILA, M., LAITINEN, S., PESALA, J., SORMUNEN, R., LEHENKARI, P. & KOIVUNEN, P. 2013. HIF-1 $\alpha$  is upregulated in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 31, 1902-9.

PRIGIONE, A., FAULER, B., LURZ, R., LEHRACH, H. & ADJAYE, J. 2010. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 28, 721-33.

PRIGIONE, A., LICHTNER, B., KUHL, H., STRUYS, E. A., WAMELINK, M., LEHRACH, H., RALSER, M., TIMMERMANN, B. & ADJAYE, J. 2011. Human induced pluripotent stem cells harbor homoplasmic and heteroplasmic mitochondrial DNA mutations while maintaining human embryonic stem cell-like metabolic reprogramming. *Stem Cells*, 29, 1338-48.

PRIGIONE, A., ROHWER, N., HOFFMANN, S., MLODY, B., DREWS, K., BUKOWIECKI, R., BLUMLEIN, K., WANKER, E. E., RALSER, M., CRAMER, T. & ADJAYE, J. 2014. HIF1 $\alpha$  modulates cell fate reprogramming through early glycolytic shift and upregulation of PDK1-3 and PKM2. *Stem Cells*, 32, 364-76.

PROWSE, A. B., CHONG, F., ELLIOTT, D. A., ELEFANTY, A. G., STANLEY, E. G., GRAY, P. P., MUNRO, T. P. & OSBORNE, G. W. 2012. Analysis of mitochondrial function and localisation during human embryonic stem cell differentiation in vitro. *PLoS One*, 7, e52214.

REHMAN, J. 2010. Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells. *J Mol Med (Berl)*, 88, 981-6.

REINHOLD, R., KRUGER, V., MEINECKE, M., SCHULZ, C., SCHMIDT, B., GRUNAU, S. D., GUIARD, B., WIEDEMANN, N., VAN DER LAAN, M., WAGNER, R., REHLING, P. & DUDEK, J. 2012. The channel-forming Sym1 protein is transported by the TIM23 complex in a presequence-independent manner. *Mol Cell Biol*, 32, 5009-21.

RENARD, P. M., S.; ROMMELAERE, G.; ARNOULD, T. 2012, Mammalian mitochondrial genetics, genomics and turnover, *Cellular Bioenergetics in Health and Diseases: New Perspectives in Mitochondrial Biology*. Kerala, India: Research Signpost, p. 1-83

ROBBERSON, D. L., KASAMATSU, H. & VINOGRAD, J. 1972. Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 737-41.

ROWLAND, B. D., BERNARDS, R. & PEEPER, D. S. 2005. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol*, 7, 1074-82.

SATHANANTHAN, H., PERA, M. & TROUNSON, A. 2002. The fine structure of human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online*, 4, 56-61.

SATHANANTHAN, H., SELVARAJ, K. & CLARK, J. 2011. The fine structure of human germ layers in vivo: clues to the early differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Reprod Biomed Online*, 23, 227-33.

SCARPULLA, R. C. 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*, 88, 611-38.

SPENCER, J. A., FERRARO, F., ROUSSAKIS, E., KLEIN, A., WU, J., RUNNELS, J. M., ZAHER, W., MORTENSEN, L. J., ALT, C., TURCOTTE, R., YUSUF, R., COTE, D., VINOGRADOV, S. A., SCADDEN, D. T. & LIN, C. P. 2014. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*, 508, 269-73.



SPIEGELMAN, B. M., HU, E., KIM, J. B. & BRUN, R. 1997. PPAR gamma and the control of adipogenesis. *Biochimie*, 79, 111-2.

SPINAZZOLA, A., VISCOMI, C., FERNANDEZ-VIZARRA, E., CARRARA, F., D'ADAMO, P., CALVO, S., MARSANO, R. M., DONNINI, C., WEIHER, H., STRISCIUGLIO, P., PARINI, R., SARZI, E., CHAN, A., DIMAURO, S., ROTIG, A., GASPARINI, P., FERRERO, I., MOOTHA, V. K., TIRANTI, V. & ZEVIANI, M. 2006. MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet*, 38, 570-5.

SPITKOVSKY, D., SASSE, P., KOLOSSOV, E., BOTTINGER, C., FLEISCHMANN, B. K., HESCHELER, J. & WIESNER, R. J. 2004. Activity of complex III of the mitochondrial electron transport chain is essential for early heart muscle cell differentiation. *FASEB J*, 18, 1300-2.

ST JOHN, J. C., RAMALHO-SANTOS, J., GRAY, H. L., PETROSKO, P., RAWE, V. Y., NAVARA, C. S., SIMERLY, C. R. & SCHATTEN, G. P. 2005. The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 7, 141-53.

TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.

THACKRAY, S. J., MOWAT, C. G. & CHAPMAN, S. K. 2008. Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem Soc Trans*, 36, 1120-3.

THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.

TORMOS, K. V., ANSO, E., HAMANAKA, R. B., EISENBART, J., JOSEPH, J., KALYANARAMAN, B. & CHANDEL, N. S. 2011. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab*, 14, 537-44.

TROTT, A. & MORANO, K. A. 2004. SYM1 is the stress-induced *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the mammalian kidney disease gene *Mpv17* and is required for ethanol metabolism and tolerance during heat shock. *Eukaryot Cell*, 3, 620-31.

TSAI, C. C., SU, P. F., HUANG, Y. F., YEW, T. L. & HUNG, S. C. 2012. Oct4 and Nanog directly regulate *Dnmt1* to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell*, 47, 169-82.

VAN DER GOOT, A. T., ZHU, W., VAZQUEZ-MANRIQUE, R. P., SEINSTRA, R. I., DETTMER, K., MICHELS, H., FARINA, F., KRIJNEN, J., MELKI, R., BUIJSMAN, R. C., RUIZ SILVA, M., THIJSEN, K. L., KEMA, I. P., NERI, C., OEFNER, P. J. & NOLLEN, E. A. 2012. Delaying aging and the aging-associated decline in protein homeostasis by inhibition of tryptophan degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 14912-7.

WANET, A., REMACLE, N., NAJAR, M., SOKAL, E., ARNOULD, T., NAJIMI, M. & RENARD, P. 2014. Mitochondrial remodeling in hepatic differentiation and dedifferentiation. *Int J Biochem Cell Biol*, 54, 174-85.

WEIHER, H., NODA, T., GRAY, D. A., SHARPE, A. H. & JAENISCH, R. 1990. Transgenic mouse model of kidney disease: insertional inactivation of ubiquitously expressed gene leads to nephrotic syndrome. *Cell*, 62, 425-34.

YEO, J. C., JIANG, J., TAN, Z. Y., YIM, G. R., NG, J. H., GOKE, J., KRAUS, P., LIANG, H., GONZALES, K. A., CHONG, H. C., TAN, C. P., LIM, Y. S., TAN, N. S., LUFKIN, T. & NG, H. H. 2014. Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell Stem Cell*, 14, 864-72.

YOUNG, J. D., YAO, S. Y., BALDWIN, J. M., CASS, C. E. & BALDWIN, S. A. 2013. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med*, 34, 529-47.

YU, W. M., LIU, X., SHEN, J., JOVANOVIĆ, O., POHL, E. E., GERSON, S. L., FINKEL, T., BROXMEYER, H. E. & QU, C. K. 2013. Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 12, 62-74.

ZHANG, J., KHVOROSTOV, I., HONG, J. S., OKTAY, Y., VERGNES, L., NUBEL, E., WAHJUDI, P. N., SETOGUCHI, K., WANG, G., DO, A., JUNG, H. J., MCCAFFERY, J. M., KURLAND, I. J., REUE, K., LEE, W. N., KOEHLER, C. M. & TEITELL, M. A. 2011. UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells. *EMBO J*, 30, 4860-73.

ZHANG, P., ANDRIANAKOS, R., YANG, Y., LIU, C. & LU, W. 2010. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J Biol Chem*, 285, 9180-9.

ZHANG, Y., MARSBOOM, G., TOTH, P. T. & REHMAN, J. 2013. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 8, e77077.

ZWACKA, R. M., REUTER, A., PFAFF, E., MOLL, J., GORGAS, K., KARASAWA, M. & WEIHER, H. 1994. The glomerulosclerosis gene Mpv17 encodes a peroxisomal protein producing reactive oxygen species. *EMBO J*, 13, 5129-34.